

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SIRLENE MARIA VUDALA

ARMAZENAMENTO DE SEMENTES, GERMINAÇÃO *IN VITRO* E  
MICROPROPAGAÇÃO DE *Hadrolaelia grandis* (LINDLEY & PAXTON)  
CHIRON & V. P. CASTRO (ORCHIDACEAE)

CURITIBA

2015

SIRLENE MARIA VUDALA

ARMAZENAMENTO DE SEMENTES, GERMINAÇÃO *IN VITRO* E  
MICROPROPAGAÇÃO DE *Hadrolaelia grandis* (LINDLEY & PAXTON)  
CHIRON & V. P. CASTRO (ORCHIDACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Botânica, Departamento de  
Botânica, Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná, como requisito  
parcial à obtenção do título de Mestre em  
Botânica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana Lopes Fortes  
Ribas

CURITIBA

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Botânica



**Título: Mestre em Ciências Biológicas - Área de Botânica.**

**Dissertação: “Armazenamento de sementes, germinação *in vitro* e micropropagação de *Hadrolaelia grandis* (Lindley & Paxton) Chiron & V.P Castro (Orchidaceae)”.**

**Candidato:** Sirlene Maria Vudala

**Comissão Examinadora:**

Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas (UFPR) – (Presidente/Orientador)  
Dra. Francine Lorena Cuquel (UFPR) – (Membro Titular)  
Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer (UNICAMP) – (Membro Titular)  
Dra. Marguerite Quoirin (UFPR) – (Suplente)

Parecer: A Comissão Examinadora, reunida nesta data, nas dependências do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, analisando o conteúdo, a forma, a apresentação e a defesa da Dissertação, **APROVA O TRABALHO DE CONCLUSÃO** do(a) aluno(a) Sirlene Maria Vudala. É de parecer que constitui um trabalho científico e recomenda a sua publicação, após as correções sugeridas.

O candidato tem 60 (sessenta) dias para as correções propostas pela Comissão, para que se possa dar continuidade ao processo.

Curitiba, 24 de agosto de 2015.

Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas (UFPR)

Dra. Francine Lorena Cuquel (UFPR)

Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer (UNICAMP)

Ciente Candidato



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Botânica



**“Armazenamento de sementes, germinação *in vitro* e micropropagação de *Hadrolaelia grandis* (Lindley & Paxton) Chiron & V.P Castro (Orchidaceae)”.**

por

Sirlene Maria Vudala

Dissertação aprovada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre no Programa  
de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão  
formada pelos doutores

Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas (UFPR)

Dra. Francine Lorena Cuquel (UFPR)

Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer (UNICAMP)

Curitiba, 24 de agosto de 2015.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Botânica

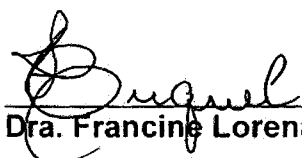


302<sup>a</sup>.

2015

Ata de Julgamento da Dissertação de Mestrado da pós-graduanda **Sirlene Maria Vudala**. Aos 24 dias do mês de agosto do ano de 2015, às oito horas e trinta minutos na Sala 421, no Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, na presença da Comissão Examinadora, composta por Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas, Dra. Francine Lorena Cuquel e Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer como titulares, foi aberta a sessão de julgamento da Dissertação intitulada: "**Armazenamento de sementes, germinação *in vitro* e micropropagação de *Hadrolaelia grandis* (Lindley & Paxton) Chiron & V.P Castro (Orchidaceae)**". Após a apresentação, perguntas e esclarecimentos acerca da Dissertação, a Comissão Examinadora **APROVA O TRABALHO DE CONCLUSÃO** do(a) aluno(a) **Sirlene Maria Vudala**. Nada mais havendo a tratar, encerrou-se a sessão da qual foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos componentes da Comissão Examinadora.

  
Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas (UFPR)

  
Dra. Francine Lorena Cuquel (UFPR)

  
Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer (UNICAMP)

Ao meu filho Eduardo  
E à toda minha família dedico  
DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Professora Dr<sup>a</sup> Luciana Lopes Fortes Ribas pela orientação. Sou muito grata pela atenção, paciência e compreensão a mim dedicadas. Pelos conhecimentos transmitidos, pelas correções, sugestões e pela preocupação em melhorar sempre meu trabalho.

Aos coordenadores Eric de Camargo Smidt e Érika Amano pelo apoio e compreensão.

Aos professores: Bárbara Moura, Cleusa Bona, Érika Amano, Henrique F. Koehler, Katia Z. Ribas, Marguerite Quoirin e Thelma Ludvig pelos valiosos conhecimentos transmitidos durante as aulas.

À CAPES-PNADB pelo suporte financeiro e ao CNPQ pela bolsa de estudos a mim concedida por 18 meses.

À colega Keila Alves do Prado que esteve sempre tão próxima, pelo apoio, companheirismo e incentivo na minha jornada.

Aos colegas do Laboratório de Micropropagação Vegetal pelo apoio nos trabalhos do laboratório.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para que eu continuasse minha jornada durante esses dois anos e concluísse o meu trabalho.

## RESUMO

*Hadrolaelia grandis* está ameaçada de extinção e sua população está em declínio devido às coletas para fins ornamentais e destruição do habitat. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de conservação de sementes, germinação *in vitro* e de propagação de *H. grandis*, em larga escala, utilizando a técnica “thin cell layer” (TCL) a partir de protocormos. O teste do tetrazólio (TZ) e a germinação *in vitro* foram realizados com sementes armazenadas a - 20 °C e - 80 °C, por 24, 30 e 36 meses. Os meios de cultura Woody Plant Medium (WPM), Murashige & Skoog (MS), Vacin & Went (VW) e Knudson C (KC) foram testados para a germinação *in vitro* e desenvolvimento dos protocormos. Para a regeneração de estruturas semelhantes à protocormos (“protocorm like bodies – PLBs”) utilizando a técnica TCL foram realizadas secções transversais (TCLt) e secções longitudinais (TCLl) em protocormos com 60 e 90 dias de idade. Os explantes foram cultivados em meio Woody Plant Medium (WPM), acrescido de 6-benzilaminopurina (BAP): 1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 µM, além do controle, sem regulador vegetal. O alongamento e enraizamento dos PLBs foi induzido em meio contendo carvão ativado (0; 1; 2 e 3 g.L<sup>-1</sup>) ou ácido indol-3-butírico (AIB) (0,0; 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0 µM). As mudas foram transplantadas em bandejas contendo: pó de coco, casca de pínus com húmus de minhoca e vermiculita. Os resultados indicaram que a temperatura de - 80 °C foi mais eficiente para o armazenamento de sementes, pois após 36 meses, a porcentagem de sementes viáveis foi mais elevada (81,86%), quando comparada a de - 20 °C (64,24%) pelo teste TZ. As sementes cultivadas no meio WPM apresentaram melhores respostas de germinação (94,71%, índice de velocidade de germinação de 25,33) e de desenvolvimento das plântulas, após 36 meses de armazenamento em temperatura de - 80 °C. A técnica TCL foi eficiente para a propagação *in vitro* de *H. grandis*, sendo que a idade e concentração de BAP influenciaram as respostas de regeneração de PLBs. Secções transversais de protocormos de 60 dias, cultivados em meio WPM, acrescido de 2,2 µM de BAP apresentaram melhores respostas para a técnica TCLt (70,8% de regeneração de PLBs e 30,1 PLBs por explante). Para a técnica TCLl foi recomendado o uso de secções de protocormos de 90 dias de idade, cultivadas em meio contendo 8,8 µM de BAP (83,3% de regeneração de PLBs e 34,4 PLBs por explante). O carvão ativado foi eficiente no alongamento e enraizamento, sendo recomendada a concentração de 1 g L<sup>-1</sup>. As mudas foram aclimatizadas com sucesso em casa de vegetação (98,21% de sobrevivência) utilizando vermiculita como substrato. O protocolo descrito nesse estudo foi eficiente para conservação de sementes, germinação *in vitro* e micropropagação utilizando a técnica TCL para a produção de mudas de *H. grandis*.

**Palavras chave:** banco de sementes, viabilidade de sementes, “thin cell layer”, regeneração de PLBs, 6-benzilaminopurina (BAP)



## ABSTRACT

*Hadrolaelia grandis* is an endangered species and its population is declining due irregular collection for ornamental purposes and habitat destruction. The objective of this study was to establish a seed conservation protocol, *in vitro* germination and large-scale propagation of *H. grandis* seedlings using the "thin cell layer" (TCL) technique from protocorms. The tetrazolium test (TZ), and *in vitro* germination were performed with seeds stored at - 20 ° C and - 80 ° C for 24, 30 and 36 months. The culture media Woody Plant Medium (WPM), Murashige and Skoog (MS) Vacin & Went (VW) and Knudson C (KC) were tested for *in vitro* germination and protocorm development. For the regeneration of the protocorm-like bodies (PLBs) using TCL technique, transversal sections were performed (tTCL) and longitudinal sections (ITCL) in protocorm from 60 and 90 days of age. The explants were cultured in Woody Plant Medium (WPM), supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP): 1.1, 2.2, 4.4, 8.8 and 17.6  $\mu\text{M}$ , and the control without plant growth regulation. The elongation and rooting of PLBs were induced in medium containing activated charcoal (0, 1, 2 and 3  $\text{g L}^{-1}$ ) or indole-3-butyric acid (IBA) (0.0, 1.25, 2.5, 5.0 and 10.0  $\mu\text{M}$ ). The seedlings were transplanted into trays containing: coco powder, pine bark with humus worm and vermiculite. The results indicated that the temperature of - 80 ° C was more efficient for storing seeds, because after 36 months, the percentage of viable seeds was higher (81.86%), when compared to - 20 ° C (64.24%) by TZ test. The seeds grown in the WPM medium showed better germination responses (94.71%, 25.33 germination speed index) and seedling development, after 36 months of storage at a temperature of - 80 ° C. The TCL technique was efficient for the *in vitro* propagation of *H. grandis*, and the age and concentration of BAP influenced PLBs regeneration responses. Transversal sections from protocorm of 60 days old, cultured in WPM supplemented with 2.2  $\mu\text{M}$  BAP responded better to tTCL technique (70.8% of PLBs PLBs regeneration and 30.1 per explant). For ITCL technique has been recommended to use sections from protocorm 90 days old, grown in medium containing 8.8  $\mu\text{M}$  of BAP (83.3% of PLBs regeneration PLBs and 34.4 per explant). The activated charcoal was effective for elongation and rooting of PLBs, and we recommended the concentration of 1  $\text{g L}^{-1}$ . The seedlings were successfully acclimatized in greenhouse (98.21% survival) using vermiculite as substrate. The protocol described in this study was efficient for conservation, seed germination and *in vitro* micropropagation using TCL technique for mass production of *H. grandis* seedlings.

**Keywords:** seed banks, seed viability, thin cell layer, PLBs regeneration, 6-benzylaminopurine (BAP)

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- TABELA 1- TESTE DE VIABILIDADE DO TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE *Hadrolaelia grandis*, APÓS ARMAZENAMENTO EM TEMPERATURAS DE - 20 °C E - 80 °C POR 24, 30 E 36 MESES. .... 36
- TABELA 2- GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE *Hadrolaelia grandis*, EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, APÓS ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES EM TEMPERATURAS DE - 20 °C E - 80 °C, POR 24, 30 E 36 MESES, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. .... 37
- TABELA 3- ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Hadrolaelia grandis*, CULTIVADAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, APÓS 24, 30 E 36 MESES DE ARMAZENAMENTO, EM TEMPERATURAS DE - 20 °C E - 80 °C. .... 37
- TABELA 4- ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE PLÂNTULAS DE *Hadrolaelia grandis* ORIUNDAS DA GERMINAÇÃO *IN VITRO*, COM 10 MESES DE IDADE, APÓS 120 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE CARVÃO ATIVADO. .... 44
- TABELA 5- PLÂNTULAS DE *Hadrolaelia grandis*, ORIUNDAS DA GERMINAÇÃO *IN VITRO*, TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS E ACLIMATIZADAS POR 12 SEMANAS EM CASA DE VEGETAÇÃO. .... 45

### CAPÍTULO 2

- TABELA 1- PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs E NÚMERO MÉDIO DE PLBs EM TCLts ORIUNDAS DE PROTOCORMOS DE *Hadrolaelia grandis* COM 60 DIAS DE IDADE, APÓS UM CULTIVO INICIAL (60 DIAS), PRIMEIRO SUBCULTIVO (60 DIAS) E SEGUNDO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO DE CULTURA WPM (CONTROLE) E ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 µM) . .... 65
- TABELA 2- PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs E NÚMERO MÉDIO DE PLBs EM TCLts ORIUNDAS DE PROTOCORMOS DE *Hadrolaelia grandis* COM 90 DIAS DE IDADE, APÓS UM CULTIVO INICIAL (60 DIAS), PRIMEIRO SUBCULTIVO (60 DIAS) E SEGUNDO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO DE CULTURA WPM (CONTROLE) E ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 µM) . .... 67

TABELA 3- PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs EM TCLIs ORIUNDAS DE PROTOCORMOS DE <i>Hadrolaelia grandis</i> COM DIFERENTES IDADES, APÓS O CULTIVO INICIAL (60 DIAS), PRIMEIRO SUBCULTIVO (60 DIAS) E SEGUNDO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO DE CULTURA WPM (CONTROLE) ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 $\mu$ M).	68
TABELA 4- ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE PLBs ORIUNDOS DA TCL de PROTOCORMOS DE <i>Hadrolaelia grandis</i> CULTIVADOS POR 120 DIAS EM MEIO WPM (CONTROLE) E ACRESCIDO DE CARVÃO ATIVADO OU ÁCIDO INDOL-3- BUTÍRICO (AIB) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.	70
TABELA 5- SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DE <i>Hadrolaelia grandis</i> ORIUNDAS DE TCLIs TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS E ACLIMATIZADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO POR 60 DIAS.	72

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- FIGURA 1- GERMINAÇÃO *IN VITRO* E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Hadrolaelia grandis*. A. SEMENTE COM EMBRIÃO. B. SEMENTE COM TESTA INCHADA. C. SEMENTE COM TESTA ROMPIDA (EMBRIÃO GERMINADO). D. PROTOCORMO COM ÁPICE CAULINAR E RIZÓIDES. E. PROTOCORMO COM FOLHA. (FIGURAS A – E. BARRA: 1 mm). DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS EM MEIO DE CULTURA: F. WPM E G. MS, APÓS 24 SEMANAS DE CULTIVO (FIGURAS F – G BARRA: 10 mm). H. WPM, ACRESCIDO DE CARVÃO ATIVADO. (Barra: 20 mm). I. SOBREVIVÊNCIA PLÂNTULAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS (BARRA: 30 mm). ..... 39
- FIGURA 2- FREQUÊNCIA (%) DOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DOS PROTOCORMOS DE *Hadrolaelia grandis*, ORIUNDOS DE SEMENTES ARMAZENADAS A - 80 °C POR 30 MESES E CULTIVADOS *IN VITRO* POR DUAS, QUATRO, SEIS E OITO SEMANAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. ESTÁDIO 1: SEMENTE CONTENDO EMBRIÃO VIÁVEL, 2: SEMENTE COM TESTA ROMPIDA (GERMINAÇÃO), 3: PROTOCORMO COM ÁPICE E/OU RIZÓIDES, 4: PROTOCORMO COM FOLHA. .... 40

### CAPÍTULO 2

- FIGURA 1- *Hadrolaelia grandis*. A- TCLt APICAL DE PROTOCORMO COM 60 DIAS DE IDADE CULTIVADO POR 60 DIAS EM MEIO WPM ACRESCIDO DE 4,4  $\mu\text{M}$  DE BAP. B- TCLt BASAL DE PROTOCORMO COM 60 DIAS DE IDADE CULTIVADO POR 60 DIAS EM MEIO WPM ACRESCIDO DE 1,1  $\mu\text{M}$  DE BAP. C- TCLt BASAL DE PROTOCORMO COM 90 DIAS DE IDADE CULTIVADO POR 60 DIAS EM MEIO WPM ACRESCIDO DE 8,8  $\mu\text{M}$  DE BAP. D- TCLi DE PROTOCORMO COM 60 DIAS DE IDADE APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO EM MEIO WPM ACRESCIDO DE 17,6  $\mu\text{M}$  DE BAP. E- TCLi DE PROTOCORMO COM 90 DIAS DE IDADE APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO WPM ACRESCIDO DE 8,8  $\mu\text{M}$  DE BAP. FIGURAS 1A A 1E (BARRA: 3 mm). F- ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE PLBs ORIUNDOS DE TCL CULTIVADOS POR 120 DIAS EM MEIO WPM ACRESCIDO DE 2 g L<sup>-1</sup> DE CARVÃO ATIVADO. G- TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS APÓS 60 DIAS DE CULTIVO EM CASA DE VEGETAÇÃO. FIGURAS 1F e 1G (BARRA: 30 mm). ..... 71

## ANEXOS

### CAPÍTULO1

ANEXO 1- COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA GERMINAÇÃO DE <i>Hadrolaelia grandis</i> . ....	51
ANEXO 2- COMPOSIÇÃO IÔNICA DOS MACRONUTRIENTES NOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA GERMINAÇÃO. ....	51
ANEXO 3- COMPOSIÇÃO DOS MICRONUTRIENTES NOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA GERMINAÇÃO. ....	52
ANEXO 4- ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO TESTE DO TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE <i>Hadrolaelia grandis</i> , APÓS ARMAZENAMENTO EM TEMPERATURAS DE - 20 °C E - 80 °C POR 24, 30 E 36 MESES. ....	52
ANEXO 5- ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SEMENTES DE <i>Hadrolaelia grandis</i> , EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, APÓS ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES EM TEMPERATURAS DE - 20 °C E - 80 °C, POR 24, 30 E 36 MESES, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. ....	53
ANEXO 6- ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE <i>Hadrolaelia grandis</i> , CULTIVADAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, APÓS 24, 30 E 36 MESES DE ARMAZENAMENTO, EM TEMPERATURAS DE - 20 °C E - 80 °C. ....	53
ANEXO 7- ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA FREQUÊNCIA (%) DOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DOS PROTOCORMOS DE <i>Hadrolaelia grandis</i> , ORIUNDOS DE SEMENTES ARMAZENADAS A - 80 °C POR 30 MESES E CULTIVADOS <i>IN VITRO</i> POR DUAS, QUATRO, SEIS E OITO SEMANAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. ....	54
ANEXO 8- ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE PLÂNTULAS DE <i>Hadrolaelia grandis</i> ORIUNDAS DA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> EM WPM (CONTROLE) E WPM ACRESCIDO DE CARVÃO ATIVADO(1; 2 E 3 g L <sup>-1</sup> ) APÓS 120 DIAS DE CULTIVO. ....	55
ANEXO 9- ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE PLANTAS DE <i>Hadrolaelia grandis</i> ORIUNDAS DA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS E ACLIMATIZADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO APÓS 12 SEMANAS DE CULTIVO. ....	56

## CAPÍTULO 2

ANEXO 1-	ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLts ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 60 DIAS DE IDADE APÓS UM CULTIVO INICIAL (60 DIAS) EM WPM (CONTROLE) E WPM ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 $\mu$ M). ....	82
ANEXO 2-	ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLts ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 60 DIAS DE IDADE APÓS UM CULTIVO INICIAL (60 DIAS) E PRIMEIRO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E WPM ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 $\mu$ M). ....	82
ANEXO 3-	ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLts ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 60 DIAS DE IDADE APÓS UM CULTIVO INICIAL (60 DIAS), PRIMEIRO SUBCULTIVO (60 DIAS) E SEGUNDO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E WPM ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 $\mu$ M). ....	83
ANEXO 4-	ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLts ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 90 DIAS DE IDADE APÓS UM CULTIVO INICIAL (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E WPM ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 $\mu$ M). ....	83
ANEXO 5-	ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLts ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 90 DIAS DE IDADE APÓS UM CULTIVO INICIAL (60 DIAS) E PRIMEIRO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E WPM ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 $\mu$ M). ....	84
ANEXO 6-	ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLts ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 90 DIAS DE IDADE APÓS UM CULTIVO INICIAL (60 DIAS), PRIMEIRO SUBCULTIVO (60 DIAS) E SEGUNDO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E WPM ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 $\mu$ M). ....	84
ANEXO 7-	ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLIs ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 60 DIAS DE IDADE APÓS UM CULTIVO INICIAL (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E WPM ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 $\mu$ M). ....	85
ANEXO 8-	ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLIs ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 60 DIAS DE IDADE APÓS UM CULTIVO INICIAL (60 DIAS) E PRIMEIRO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E WPM ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 $\mu$ M). ....	85
ANEXO 9-	ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLIs ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 60 DIAS DE IDADE APÓS UM CULTIVO INICIAL (60 DIAS), PRIMEIRO SUBCULTIVO (60 DIAS) E	

	SEGUNDO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E WPM ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 $\mu$ M). ....	85
ANEXO 10-	ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLIs ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 90 DIAS DE IDADE APÓS UM CULTIVO INICIAL (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E WPM ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 $\mu$ M). ....	86
ANEXO 11-	ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLIs ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 90 DIAS DE IDADE APÓS UM CULTIVO INICIAL (60 DIAS) E PRIMEIRO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E WPM ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 $\mu$ M). ....	86
ANEXO 12-	ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLIs ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 90 DIAS DE IDADE APÓS UM CULTIVO INICIAL (60 DIAS), PRIMEIRO SUBCULTIVO (60 DIAS) E SEGUNDO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E WPM ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 $\mu$ M). ....	87
ANEXO 13-	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE PLBs DE EM WPM (CONTROLE) E WPM ACRESCIDO DE CARVÃO ATIVADO (1, 2 E 3 g L <sup>-1</sup> ). ....	87
ANEXO 14-	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE PLBs DE EM WPM (CONTROLE) E WPM ACRESCIDO DE AIB (1,25; 2,5; 5,0 2 10,0 $\mu$ M). ....	88
ANEXO 15-	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DE <i>Hadrolaelia grandis</i> ORIUNDAS DE TCLs TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS E ACLIMATIZADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO POR 60 DIAS. ....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIB: ácido indol-3-butírico  
BAP: 6-benzilaminopurina  
CPHM: Casca de pínus com húmus de minhoca  
KC: Meio de Knudson (1946)  
MS: Meio de Murashige e Skoog (1962)  
OSSU: "Orchid Seed Stores for Sustainable Use"  
PC: Pó de coco  
PLBs: "protocorm-like bodies"  
TCL: "thin cell layer"  
TCLI: "thin cell layer longitudinal"  
TCLt: "thin cell layer transversal"  
TZ: teste do tetrazólio  
V: Vermiculita  
VW: Meio de Vacin e Went (1949)  
WPM: Meio de Lloyd e McCown (1980)



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	20
2.1 OBJETIVO GERAL .....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	21
<b>CAPÍTULO 1- ARMAZENAMENTO DE SEMENTES E GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Hadrolaelia grandis</i> (LINDLEY &amp; PAXTON) CHIRON &amp; V. P. CASTRO, (ORCHIDACEAE)</b> .....	26
<b>RESUMO</b> .....	26
<b>ABSTRACT</b> .....	27
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	28
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
2.1 MATERIAL VEGETAL .....	30
2.2 TESTE DE VIABILIDADE DE SEMENTES .....	30
2.3 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	31
2.4 ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO .....	32
2.5 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO .....	32
2.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	33
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	33
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	34
3.1 TESTE DE VIABILIDADE DE SEMENTES .....	34
3.2 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	36
3.3 ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO .....	43
3.4 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO .....	44
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	45
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	47
<b>ANEXOS</b> .....	51
<b>CAPÍTULO 2- MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Hadrolaelia grandis</i> (LINDLEY &amp; PAXTON) CHIRON &amp; V. P. CASTRO PELA TÉCNICA “THIN CELL LAYER” (TCL)</b> .....	57
<b>RESUMO</b> .....	57
<b>ABSTRACT</b> .....	58
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	59
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	61
2.1 LOCAL DE ESTUDO .....	61
2.2 MATERIAL VEGETAL .....	62

2.3 TCLts E TCLIs DE PROTOCORMOS .....	62
2.4 ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO .....	63
2.5 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	63
2.6 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO .....	64
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	64
<b>3 RESULTADOS</b> .....	65
3.1 TCLts DE PROTOCORMOS COM 60 DIAS DE IDADE .....	65
3.2 TCLts DE PROTOCORMOS COM 90 DIAS DE IDADE .....	66
3.3 TCLIs DE PROTOCORMOS COM 60 DIAS DE IDADE .....	67
3.4 TCLIs DE PROTOCORMOS COM 90 DIAS DE IDADE .....	69
3.5 ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO .....	69
3.6 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO .....	70
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	72
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	76
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78
<b>ANEXOS</b> .....	82
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	89

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil apresenta uma das maiores diversidades de orquídeas do mundo, com 2553 espécies distribuídas em 238 gêneros, sendo que 1636 destas espécies são endêmicas (BARROS *et al.*, 2015). *Hadrolaelia grandis* é uma espécie muito apreciada como ornamental, pela beleza de suas flores, com sépalas e pétalas encrespadas, de coloração amarelo-bronzeado, com labelo branco, fortemente estriado de lilás. Essa espécie apresenta muitos sinônimos e anteriormente era classificada como *Laelia grandis*, baseada apenas em observações morfológicas. Chiron e Castro Neto (2002) confirmaram a existência de dois grupos bem distintos: as espécies mexicanas (verdadeiras *Laelias*) e as espécies brasileiras, que foram separadas por meio de análises moleculares. O gênero *Hadrolaelia* (Schlechter) Chiron & V. P. Castro é composto por 19 espécies, divididas em seis seções: *Hadrolaelia*, *Crispae*, *Virens*, *Fidelensis*, *Perriniae* e *Sophronitis*, sendo que *H. grandis* pertence à seção *Crispae*.

*H. grandis* é uma espécie epífita, endêmica da Mata Atlântica, que ocorre nos estados da Bahia e Espírito Santo. Sua população vem decrescendo em decorrência de coletas para fins ornamentais e da destruição do habitat, por isso encontra-se no Livro Vermelho da Flora do Brasil como vulnerável (MARTINELLI e MORAES, 2013). Os bancos de sementes constituem uma importante estratégia de conservação *ex situ* à longo prazo. Eles possibilitam a manutenção da capacidade germinativa de sementes, em um pequeno espaço físico e por um período bem maior que em condições naturais, além de manter a diversidade biológica possibilitando assim, a re-

introdução de espécies em seus habitats e a restauração de áreas degradadas (SEATON e PRITCHARD, 2011). O projeto Darwin Initiative “Orchid Seed Stores for Sustainable Use” (OSSSU) está estabelecendo uma rede global de bancos de sementes de orquídeas e iniciou em países com alta biodiversidade, como Ásia e América Latina (SEATON e PRITCHARD, 2011). No Brasil, a Universidade Federal do Paraná e a Universidade do Oeste do Paraná participam do projeto da OSSSU, onde sementes de orquídeas de diversas espécies têm sido armazenadas e testes periódicos de viabilidade, como o do tetrazólio (TZ) e de germinação *in vitro* vêm sendo realizados para avaliar a eficiência do armazenamento em baixas temperaturas.

As sementes de orquídeas são muito pequenas, desprovidas de endosperma e com isso, a taxa de germinação na natureza é muito baixa, menor que 5%. Todas as espécies da família Orchidaceae dependem de associações micorrízicas para a germinação e para o estabelecimento do protocormo (embrião recém-germinado de sementes de orquídeas, com formato ovóide, contendo um ou mais órgãos foliares) em seu ambiente natural (LEROUX *et al.*, 1997; PEREIRA *et al.*, 2003). A germinação *in vitro* de orquídeas é um importante meio de produção de mudas e aumenta significativamente o índice germinativo em relação à germinação em condições naturais (MARTINI *et al.*, 2001).

Muitos meios de cultura são utilizados no cultivo *in vitro* de orquídeas e ainda não há uma formulação específica, pois a resposta das sementes na germinação e morfogênese de um tecido cultivado *in vitro* está sujeita a fatores físicos (intensidade luminosa, fotoperíodo, temperatura) e químicos (concentração e composição de macro e micronutrientes) que diferem de uma

espécie para outra (ARDITTI e ERNST, 1993). Os meios MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), KC (KNUDSON C, 1946) e VW (VACIN e WENT, 1949) têm sido utilizados no cultivo *in vitro* de orquídeas, como *Dendrobium aqueum* (ROBINSON *et al.*, 2009), *Anselia africana* (VASUDEVAN e VAN STADEN, 2010), *Cymbidium giganteum* (HOSSAIN *et al.*, 2010), *Vanda coerulea* (ROY *et al.*, 2011), *Cymbidium mastersii* (MOHANTY *et al.*, 2012), *Hoffmannseggella cinnabarina* (SUZUKI *et al.*, 2012), *Cymbidium aloifolium* (PRADHAN *et al.*, 2013), *Vanda testacea* (SEBASTINRAJ *et al.*, 2014) e *Dimorphics lowii* (BAKAR *et al.*, 2014). O meio WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980) foi eficiente para o cultivo *in vitro* de *Epidendrum secundum* (FERREIRA *et al.*, 2015).

Além da germinação *in vitro*, técnicas de cultura de tecidos que permitem a regeneração de plantas têm sido utilizadas para multiplicação massal de orquídeas. Uma das técnicas bem sucedidas é a “thin cell layer” (TCL). Consiste de finos cortes com poucas camadas de células contendo um ou mais tipos de tecidos. Os cortes podem ser feitos em sentido longitudinal (TCLl) ou transversal (TCLt) e diferentes órgãos da planta podem ser utilizados como fonte de explantes (TEIXEIRA DA SILVA, 2010). Em orquídeas, os protocormos têm sido utilizados com sucesso como fonte de explantes da TCL em *Dendrobium gratiosissimum* (JAIPHET e RANGSAYATORN, 2010), *Epidendrum secundum* (FERREIRA *et al.*, 2015) e *Brasilidium forbesii* (GOMES, FRANCESCHI e RIBAS, 2015). Os protocormos têm capacidade de regenerar estruturas semelhantes à protocormos (“protocorm-like bodies” - PLBs), com células meristemáticas e com capacidade de regenerar plantas (TEIXEIRA DA SILVA *et al.*, 2005). Teixeira da Silva e Tanaka (2006) constataram por meio de análises histológicas e citológicas que os PLBs são

equivalentes a embriões somáticos. Na cultura de tecidos de orquídeas é possível a formação direta de PLBs sem passar pela fase de calo, com isso, a regeneração de plantas ocorre de maneira mais rápida (TEIXEIRA DA SILVA *et al.*, 2005).

Os reguladores vegetais são importantes controladores do crescimento e desenvolvimento das plantas e, na cultura de tecidos de orquídeas, o uso de citocininas isoladas ou combinadas com auxinas é importante para a regeneração de PLBs (NOVAK *et al.*, 2014). A citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido eficiente na indução e regeneração de PLBs de diversas espécies, como *Dendrobium candidum* (ZHAO *et al.*, 2007), *Dendrobium draconis* (RAGSAYATORN, 2009), *Coelogyne cristata* (NAING *et al.*, 2011), *Dendrobium primolimun* (PANT e THAPA, 2012) e *Eclipta alba* (SINGH *et al.*, 2012), entre outras.

Após a fase de regeneração de PLBs, essas estruturas são separadas e cultivadas em meios de cultura, acrescidos ou não de carvão ativado ou auxinas para alongamento e desenvolvimento de raízes. O carvão ativado tem um papel importante na cultura de tecido de plantas, melhorando as respostas morfogênicas dos tecidos, como de crescimento e desenvolvimento das células (THOMAS, 2008). O carvão ativado, combinado ou não com auxina induz o enraizamento de muitas plantas (THOMAS, 2008). Esse composto tem sido testado no enraizamento de diversas espécies de orquídeas como: *Cypripedium flavum* (YAN *et al.*, 2006), híbridos de *Dendrobium* (MARTIN e MADASSERY, 2006) e *Cattleya harrisoniana* (SCHNEIDERS *et al.*, 2012). O ácido indol-3-butírico (AIB) também tem sido utilizado para indução de raízes de diversas espécies de orquídeas, como *Cymbidium alaifolium* e *Dendrobium*

*nobile* (NAYAK *et al.*, 2002), *Rhynchostylis retusa* (THOMAS e MICHAEL, 2007), *Satyrium nepalense* (MAHENDRAN e BAI, 2009), *Cymbidium faberi* (TAO *et al.*, 2011), *Dendrobium sabin* (RAFIQUE *et al.*, 2012), *Dendrobium nobile* (MOHANTI *et al.*, 2012a), *Cymbidium mastersii* (MOHANTI *et al.*, 2012b), *Vanda testacea* (SEBASTINRAJ *et al.*, 2014) e *Cattleya* sp. (DEWIR *et al.*, 2015).

O transplântio e aclimatização de mudas são um dos problemas na micropropagação de orquídeas, que muitas vezes não sobrevivem ao cultivo *ex vitro*, pois esse ambiente não é asséptico, tem umidade relativa do ar mais baixa, maior intensidade luminosa e, além disso, as plantas cultivadas *in vitro* tem menor capacidade fotossintética e transpiram mais (HAZARIKA, 2003). Uma planta com um bom enraizamento tem maior probabilidade de sobrevivência no cultivo *ex vitro*, pois absorve mais água, compensando a perda no início do processo (DEWIR *et al.*, 2005). Além da luminosidade, temperatura e umidade, o substrato é extremamente importante para o desenvolvimento e sobrevivência das mudas nessa fase. Ele deve ter alta porosidade, capacidade de absorção e drenagem de água (DEBERGH e ZIMMERMAN, 1991). O xaxim foi muito utilizado como substrato para o transplântio de orquídeas, mas devido ao extrativismo desenfreado, está ameaçado de extinção (LORENZI e SOUSA, 1995). Por isso, substratos alternativos como fibra e pó de coco, casca de pínus, vermiculita e outros têm sido testados para *Cattleya* chocolate drop x (*C. guttata* x *L. tenebrosa*) (COLOMBO *et al.*, 2005), *Cattleya intermedia* (LONE *et al.*, 2008) e *Laelia tenebrosa* (ANTONIETTI *et al.*, 2014).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de conservação de sementes, germinação *in vitro* e micropropagação a partir de protocormos, utilizando a técnica ‘thin cell layer’, para a produção em larga escala de mudas de *Hadrolaelia grandis*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a viabilidade das sementes após armazenamento pelo teste do tetrazólio;

b) Identificar a melhor temperatura e tempo de armazenamento para estabelecimento e manutenção de bancos de sementes;

c) Determinar o melhor meio de cultura para a germinação *in vitro*;

d) Selecionar a melhor idade, região do protocormo, tipo de secção e concentração de BAP para indução e regeneração de PLBs;

e) Avaliar a eficiência do AIB e do carvão ativado no alongamento e desenvolvimento de raízes dos PLBs.

e) Selecionar o melhor substrato para transplântio e aclimatização de mudas em casa de vegetação.



## REFERÊNCIAS

- ANTONIETTI, D.; BUTTINI, S.; DA COSTA ZONETTI, P.; GUIMARÃES, A. T. B.; STEFANELLO, S. Plant growth of *Laelia tenebrosa* Rolfe treated with gibberellic acid and grown on different substrates. **Idesia**, v. 32, n. 3, p. 7-11, 2014.
- ARDITTI, J., ERNST, R. **Micropropagation of Orchids**. New York: John Wiley & Sons, 1993. 682 p.
- BAKAR, B.; LATIP, M. A.; GANSAU, J. A. Asymbiotic germination and seedling development of *Dimorphics lowii* (Orchidaceae). **Asian Journal of Plant Biology**, v. 2, n. 1, p. 28-33, 2014.
- BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. *Orchidaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 07 Out. 2015.
- CHIRON, G. R.; CASTRO NETO, V. P. Révision des espèces brésiliennes du genre *Laelia* Lindley. **Richardiana**, v. 2, n. 1, p. 4-28, 2002.
- COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 27, n. 1, p. 145-150, 2005.
- DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. 484 p.
- DEWIR, Y. H.; CHAKRABARTY, D.; ALI, M. B.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Effects of hydroponic solution EC, substrates, PPF and nutrient scheduling on growth and photosynthetic competence during acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* plantlets. **Plant Growth Regulation**, v. 46, n. 3, p. 241-251, 2005.
- DEWIR, Y. H.; EL-MAHROUK, M. E.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Micropropagation of *Cattleya*: Improved *in vitro* rooting and acclimatization. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 89-93, 2015.
- FERREIRA, D. L.; SMIDT, E. C.; RIBAS, L. L. F. Efficient micropropagation of *Epidendrum secundum* Jacq. from leaves and protocorms. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 13, p. 1122-1128, 2015.
- GOMES, L. R. P.; FRANCESCHI, C. D. R. B.; RIBAS, L. L. F. Micropropagation of *Brasiliidium forbesii* (Orchidaceae) through transverse and longitudinal thin cell layer culture. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 37, n. 2, p. 143-149, 2015.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003.

HOSSAIN, M. M.; SHARMA, M.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; PATHAK, P. Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. **Scientia Horticulturae**, v. 123, n. 4, p. 479 - 487, 2010.

JAIPHET, C.; RANGSAYATORN, N. Micropropagation of a rare orchid *Dendrobium gratiosissimum* using thin cell layers. **Acta Horticulturae**, v. 878, p. 185-189, 2010.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**. v. 14, p. 214 - 217, 1946.

LEROUX, G.; BARABÉ, D.; VIETH, J. Morphogenesis of the protocorm of *Cypripedium acaule* Aiton (Orchidaceae). **Plant Systematics Evolution**, v. 205, n. 1, p. 53 - 72, 1997.

LLOYD, G.; McCOWN, B. H. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society**, v. 30, p. 421-427, 1980.

LONE, A. B.; BARBOSA, C. M.; TAKAHASHI, L. S. A.; FARIA, R. T. Aclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em substratos alternativos ao xaxim e ao esfagno. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 4, p. 465-469, 2008.

LORENZI, H.; SOUSA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa: Plantarum, v.1, 1995. 720 p.

MAHENDRAN, G.; BAI, V. N. Mass propagation of *Satyrium nepalense* D. Don. A medicinal orchid via seed culture. **Scientia Horticulturae**, v. 119, n. 2, p. 203-207, 2009.

MARTIN, K. P.; MADASSERY, J. Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm - like bodies. **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 95-99, 2006.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. Tradução Flávia Anderson, Chris Hieatt. - 1. ed. - Rio de Janeiro : Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

MARTINI, P. C.; WILLADINO L.; ALVES G. D.; DONATO V. M. T. S. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 10, p.1319-1324, 2001.

MOHANTY, P.; DAS, M. C.; KUMARIA, S.; TANDON, P. High-efficiency cryopreservation of the medicinal orchid *Dendrobium nobile* Lindl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, n. 2, p. 297-305, 2012a.

MOHANTY, P.; PAUL, S.; DAS, M. C.; KUMARIA, S.; TANDON, P. A simple and efficient protocol for the mass propagation of *Cymbidium mastersii*: an ornamental orchid of Northeast India. **AoB Plants**, pls 023, 2012b.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.

NAING, A.H.; CHUNG, J.D.; PARK, I.S.; LIM, K.B. Efficient plant regeneration of the endangered medicinal orchid, *Coelogyne cristata* using protocorm-like bodies. **Acta Physiology Plant**, v. 33, n. 3, p. 659 - 666, 2011.

NAYAK, N. R.; SAHOO, S.; PATNAIK, S.; RATH, P. S. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orquidaceae). **Scientia Horticulturae**, v. 94, n. 1-2, p. 107-116, 2002.

NOVAK, S. D.; LUNA, L. J.; GAMAGE, R. N. Role of Auxin in Orchid Development. **Plant Signaling & Behavior**, v. 9, n. 10, e972277, 2014.

PANT, B.; THAPA, D. *In vitro* mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. through shoot tip culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 42, p. 9970-9974, 2012.

PEREIRA, O. L.; ROLLEMBERG, C. L.; KASUYA, M. C. M. Association des mycorhizes dans les orchidees – perspectives d'utilisation dans les programmes de propagation symbiotique. **Orchidees**, v. 55, p. 24-27, 2003.

PRADHAN, S.; REGMI, T.; PARMAR, G.; PANT, B. Effect of different media on *in vitro* seed germination and seedling development of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. **Nepal Journal of Science and Technology**, v. 14, n. 1, p. 51-56, 2013.

RAFIQUE, R.; FATIMA, B.; MUSHTAQ, S.; IQBAL, M. S.; RASHEED, M.; ALI, M.; HASAN, S. U. Effect of indole-3-butyric acid (IBA) on *in vitro* root induction in *Dendrobium* orchid (*Dendrobium sabin* H.). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 20, p. 4673-4675, 2014.

RANGSAYATORN, N. Micropropagation of *Dendrobium draconis* Rchb. f. from thin cross-section culture. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 4, p. 662-665, 2009.

ROBINSON, J. P.; BALAKRISHNAN, V.; BRITTO, J. *In vitro* seed germination and protocorm development of *Dendrobium aqueum* Lindl. a rare orchid species from eastern ghats of Tamil Nadu. **Botany Research International**, v. 2, n. 2, p. 99-102, 2009.

ROY, A. R.; PATEL, R. S.; PATEL, V. V.; SAJEEV, S.; DEKA, B. C. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl. (Blue Vanda): an *in vitro* protocol for an endangered orchid. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 3, p. 325-331, 2011.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n.2, p. 185-191, 2012.

SEATON, P. T.; PRITCHARD, H. W. Orchid seed stores for sustainable use: a model for future seed-banking activities. **Lankesteriana**, v. 11, n. 3, p. 349-353, 2011.

SEBASTINRAJ, J.; BRITTO, S. J.; KUMAR, D. V.; ROBINSON, J. P.; THANGAVEL, P. Rapid Propagation of *Vanda testacea* (Lindl.) Rchb. F.—A highly medicinal value epiphytic orchid of India. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 10, n. 5, p. 223-230, 2014.

SINGH, S. K.; RAI, M. K.; SAHOO, L. An improved and efficient micropropagation of *Eclipta alba* through transverse thin cell layer culture and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 328-333, 2012.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. **In Vitro Cellular & Development Biology - Plant**, v. 48, n.5, p. 500-511, 2012.

TAO, J.; YU, L.; KONG, F.; ZHAO, D. Effects of plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Cymbidium faberi* Rolfe. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 69, p. 15639-15646, 2011.

TEIXEIRA DA SILVA, J.A. Thin cell layers: power-tool for organogenesis of floricultural crops. In: JAIN, S.M.; OCHATT, S. J. **Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants**. New York: Humana Press, p. 377-391, 2010.

TEIXEIRA DA SILVA, J.A.; TANAKA, M. Embryogenic callus, PLB and TCL paths to regeneration in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 25, p. 203-210, 2006.

TEIXEIRA DA SILVA, J.A.; YAM, T.; FUKAI, S.; NAYAK, N.; TANAKA, M. Establishment of optimum nutrient media for *in vitro* propagation of *Cymbidium* Sw. (Orchidaceae) using protocorm-like body segments. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 5, p. 129-136, 2005.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 618-631, 2008.

THOMAS, T. D.; MICHAEL, A. High-frequency plantlet regeneration and multiple shoot induction from cultured immature seeds of *Rhynchostylis retusa* Blume., an exquisite orchid. **Plant Biotechnology Reports**, v. 1, n. 4, p. 243-249, 2007.

VACIN, E.F.; WENT, E.W. Some pH in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v.110, p. 605-617, 1949.

VASUDEVAN, R.; VAN STADEN, J. *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. **Scientia Horticulturae**, v. 123, n. 4, p. 496-504, 2010.

YAN, N.; HU, H.; HUANG, J.; XU, K.; WANG, H.; ZHOU, Z. Micropropagation of *Cypripedium flavum* through multiple shoots of seedlings derived from mature seeds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 84, p. 113-117, 2006.

ZHAO, P.; WANG, W.; FENG, F. S.; WU, F.; YANG, Z. Q.; Wang, W. J. High-frequency shoot regeneration through transverse thin cell layer culture in *Dendrobium candidum* Wall Ex Lindl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, n. 2, p. 131-139, 2007.

## Capítulo I

### **Armazenamento de sementes e germinação *in vitro* de *Hadrolaelia grandis* (Lindley & Paxton) Chiron & V. P. Castro (Orchidaceae)**

#### **RESUMO**

*Hadrolaelia grandis* é uma espécie muito apreciada como planta ornamental e está ameaçada de extinção, necessitando de um programa de conservação. Os bancos de sementes e a germinação assimbiótica são importantes alternativas para conservação *ex situ* de espécies ameaçadas de extinção. Esse estudo teve como objetivo determinar a melhor condição de armazenamento de sementes, o melhor meio para germinação *in vitro* e desenvolvimento de plântulas e o substrato mais adequado para estabelecer um protocolo de conservação e propagação de mudas de *H. grandis*. O teste do tetrazólio (TZ) e a germinação *in vitro* foram avaliados após armazenamento de sementes a - 20 °C e - 80 °C, por 24, 30 e 36 meses. Os meios de cultura Woody Plant Medium (WPM), Murashige & Skoog (MS), Vacin & Went (VW) e Knudson C (KC) foram testados para a germinação *in vitro* e desenvolvimento dos protocormos. A temperatura de - 80 °C foi mais eficiente para o armazenamento de sementes, pois após 36 meses, a porcentagem de sementes viáveis foi mais elevada (81,86%), quando comparada à de - 20 °C (64,24%) pelo teste TZ. As sementes cultivadas no meio WPM apresentaram melhores respostas de germinação (94,71% e índice de velocidade de germinação de 25,33) e de desenvolvimento das plântulas, após 36 meses de armazenamento em temperatura de - 80 °C. As plântulas alongaram, desenvolveram raízes em meio WPM contendo carvão ativado (1 g L<sup>-1</sup>) após 16 semanas e foram aclimatizadas com sucesso utilizando vermiculita como substrato (91,07% de sobrevivência). O protocolo descrito nesse estudo foi eficiente para conservação de sementes, germinação *in vitro* e produção de mudas de *H. grandis*.

**Palavras-chave:** banco de sementes, viabilidade de sementes, teste do tetrazólio, meios de cultura.

## Chapter I

### Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Lindley & Paxton) Chiron & V. P. Castro (Orchidaceae)

#### ABSTRACT

*Hadrolaelia grandis* is an ornamental plant species much appreciated but endangered, thus requiring a conservation program. Seed banks and assimbiótica germination are important alternatives for *ex situ* conservation of endangered species. This study aimed to determine the best seed storage conditions, the best germination medium and development of seedlings and the most suitable substrate to establish a conservation and propagation protocol for *H. grandis*. Tetrazolium test (TZ) and *in vitro* germination was evaluated with seeds stored at - 20 °C and - 80 °C for 24, 30, and 36 months. The Woody Plant Medium (WPM), Murashige & Skoog (MS), Vacin & Went (VW) and Knudson C (KC) culture media were tested for *in vitro* germination and protocorm development. The temperature of - 80 °C was the most effective for storing seeds, since after 36 months, the percentage of viable seeds was higher (81.86%) than those stored at - 20 °C (64.24%), by TZ test. Seeds grown on the WPM medium showed better germination responses (94.71% germination and germination speed index 25.33) and better seedling development, after 36 months of storage at - 80 °C. Shoot elongation and rooting was achieved on WPM medium containing activated charcoal (1 g L<sup>-1</sup>) after 16 weeks and seedlings were successfully acclimatized after 12 weeks (91.07% survival) using vermiculite as substrate. The protocol described herein was efficient for seed conservation, *in vitro* germination and production of seedlings of *H. grandis*.

**Keywords:** seed bank, seed viability, tetrazolium test, culture media.

## 1 INTRODUÇÃO

*Hadrolaelia grandis* é uma espécie pertencente à família Orchidaceae, epífita, muito apreciada como planta ornamental e endêmica da Mata Atlântica dos estados da Bahia e Espírito Santo (BARROS *et al.*, 2015). Apresenta flores grandes com pétalas e sépalas de coloração amarela-bronze, lobo central do labelo rosa e lobos laterais brancos (ARAÚJO e ARAÚJO, 2008). Essa espécie consta no Livro Vermelho da Flora do Brasil como vulnerável devido ao declínio populacional decorrente de coletas para fins ornamentais e da destruição do habitat (MARTINELLI e MORAES, 2013).

As orquídeas produzem sementes muito pequenas e desprovidas de endosperma, dificultando a propagação pelos métodos convencionais, com porcentagem de germinação menor do que 5%, em condições naturais (ARDITTI e ERNST, 1993). Além disso, dependem de associação micorrízica para germinação e desenvolvimento inicial do protocormo. O desenvolvimento da planta é lento, levando vários anos para atingir o estágio reprodutivo (FERREIRA e SUZUKI, 2008). A dificuldade de propagação por sementes na natureza, aliada a ameaça de extinção de muitas espécies de orquídeas, tem demonstrado a necessidade de estabelecimento de banco de sementes e o desenvolvimento de estratégias de conservação *ex situ* (SWARTS e DIXON, 2009). As sementes mantidas em bancos de sementes, com baixo teor de umidade e em baixas temperaturas podem ter sua viabilidade e poder germinativo preservados por um longo período (SARASAN *et al.*, 2006). As sementes de orquídeas apresentam um comportamento ortodoxo e maior longevidade quando sujeitas à secagem (< 5% de umidade) e congelamento



(- 20 °C), em condições comumente utilizadas em bancos de sementes (SEATON *et al.*, 2013).

A viabilidade das sementes comumente é avaliada pelo teste do tetrazólio (TZ) e pela germinação *in vitro*. Vários meios de cultura como MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), KC (KNUDSON, 1946) e VW (VACIN e WENT, 1949) têm sido utilizados com sucesso para germinação de várias espécies de orquídeas (ARDITTI e ERNST, 1993). No entanto, estudos recentes têm indicado que nem sempre o meio ideal para a germinação inicial foi o melhor para o desenvolvimento das plântulas (KAUTH *et al.*, 2008). A técnica de semeadura de orquídeas *in vitro* torna possível o aproveitamento máximo de sementes, pois quase 100% das sementes germinam. Porém, esse processo tem como desvantagem a necessidade de um período de aclimatização, sendo necessário que a plântula habite um substrato que lhe propicie boas condições para o seu melhor desenvolvimento (MORAES *et al.*, 2002). Vários substratos alternativos ao xaxim, que se encontra em risco de extinção, estão sendo testados, como: fibra de coco e pó de coco, casca de pinus, casca de arroz carbonizada, sabugo de milho e vermiculita, entre outros (SORACE *et al.*, 2009; MACEDO *et al.*, 2014).

Com isso, os objetivos desse estudo foram: avaliar a viabilidade das sementes armazenadas em diferentes temperaturas e períodos; determinar o melhor meio para germinação *in vitro* e desenvolvimento de protocormos e avaliar o desenvolvimento *ex vitro* de plântulas em diferentes substratos para estabelecer um protocolo de conservação e propagação *in vitro* de *Hadrolaelia grandis*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

As sementes de *H. grandis* foram fornecidas pelo Laboratório de Filogenia, Genética e Conservação de Plantas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). As sementes foram armazenadas a - 20 °C e - 80 °C em pequenos frascos de vidro, contidos em frascos maiores juntamente com sílica laranja, utilizada como indicador de umidade, conforme recomendação de Seaton e Ramsay (2005).

### 2.2 TESTE DE VIABILIDADE DE SEMENTES

O teste bioquímico de tetrazólio foi realizado com sementes após armazenamento a - 20 °C e - 80 °C por três períodos (24, 30 e 36 meses). Foram utilizadas duas amostras de sementes (1 mg) para cada temperatura e período de armazenamento, as quais foram pré-condicionadas em solução de sacarose a 10% por 24 horas, seguido de transferência para a solução de tetrazólio a 1%, por mais 24 horas, sendo mantidas em banho-maria à temperatura constante de 38 °C. Em seguida, cinco alíquotas (0,3 mL) de cada amostra foram colocadas em placa de Petri com fundo azul, observadas em microscópio estereoscópico Motic, modelo SMZ-171 e fotografadas com câmera digital Sony Cyber Shot DSC-P200. Em cada alíquota foram contadas 100 sementes, as quais foram classificadas em viáveis (coloração vermelha), inviáveis (coloração branca) e sem embrião (palha). Após a avaliação, as sementes utilizadas no teste do tetrazólio foram descartadas.

## 2.3 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

Sementes armazenadas a - 20 °C e - 80 °C por três períodos (24, 30 e 36 meses) também foram utilizadas para a germinação *in vitro*. Em câmara de fluxo laminar, as sementes (4 mg) foram desinfestadas com etanol 70% por um minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,75% (v/v), acrescido de 0,1% de Tween 20 por cinco minutos. Em seguida, foram transferidas para um funil revestido com papel filtro esterilizado, onde foram realizadas seis lavagens com água destilada esterilizada. As sementes secas foram distribuídas em placas de Petri, sendo cinco placas por tratamento, cada uma contendo 40 mL de meio de cultura. Os meios de cultura testados foram: MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), KC (KNUDSON C, 1946), WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980) e VW (VACIN e WENT, 1949) Himedia® (ANEXOS 1, 2 e 3). Os meios MS, KC e WPM foram suplementados com 5,6 g L<sup>-1</sup> de ágar Himedia® e 3% de sacarose e a formulação comercial VW continha 8 g L<sup>-1</sup> de ágar e 2% de sacarose (ANEXO 1). O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N, antes da adição do ágar e os meios foram esterilizados a 121 °C por 20 minutos.

Para avaliação da germinação foram marcados cinco campos com 100 sementes por placa e esses campos foram observados e fotografados com câmera digital a cada duas semanas. A porcentagem de germinação foi avaliada após oito semanas, sendo considerada germinada a semente com testa rompida. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado pela fórmula proposta por Maguire (1962) e simplificada por Hosomi *et al.* (2011):

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \frac{G_3}{N_3} + \frac{G_4}{N_4}, \text{ onde } G_1, G_2, G_3 \text{ e } G_4 \text{ representam a quantidade de}$$

sementes germinadas em cada período e  $N_1, N_2, N_3$  e  $N_4$ , o intervalo de tempo

em cada período de contagem. As avaliações de IVG foram feitas após duas, quatro, seis e oito semanas. Os estádios de desenvolvimento foram classificados conforme Seaton e Ramsay (2005) adaptado: 1- semente contendo embrião viável (FIGURA 1C); 2- semente com testa rompida (FIGURA 1D); 3- protocormo com ápice e/ou rizóides (FIGURAS 1E e 1F) e 4- protocormo com folha (FIGURA 1G). As porcentagens de diferentes estádios de desenvolvimento foram avaliadas após duas, quatro, seis e oito semanas, sendo calculadas multiplicando o número de sementes/protocormos de cada estádio por 100 e dividindo pelo número total de sementes e protocormos (estádios 1 a 4).

## 2.4 ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO

Plântulas com aproximadamente 0,5 cm de altura, obtidas da germinação *in vitro*, após 10 meses de cultivo foram inoculadas em frascos contendo o meio de cultura WPM, acrescido de: 1; 2 e 3 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Foram colocadas seis plântulas por frasco e 10 repetições, totalizando 60 plântulas por tratamento. Após 16 semanas de cultivo foram avaliadas as variáveis: porcentagem de enraizamento, número médio de raízes, comprimento médio das três maiores raízes e altura média da parte aérea das plântulas.

## 2.5 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO

As mudas com aproximadamente 1,5 cm de altura, contendo três folhas foram retiradas dos frascos, as raízes lavadas e transplantadas em bandejas de poliestireno contendo os seguintes substratos: 1- pó de casca de coco

Vitaplan®; 2- casca de pínus e húmus de minhoca Vitaplan®; 3- pó de casca de coco + casca de pínus e húmus de minhoca (1:1); 4- pó de casca de coco + casca de pínus e húmus de minhoca + vermiculita (1:1:1) e 5- vermiculita expandida Eucatex®. Cada tratamento foi constituído de oito plantas e sete repetições, totalizando 56 plantas. As mudas foram aclimatizadas em casa de vegetação, irrigadas manualmente a cada três dias e após doze semanas foi avaliada a porcentagem de sobrevivência, altura da parte aérea (cm), o número médio de raízes, comprimento das três maiores raízes (cm), o número de folhas e a massa fresca (g).

## 2.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para a germinação *in vitro* foram utilizadas placas de Petri (10 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura) contendo 40 ml de meio de cultura. Para a etapa de alongamento e enraizamento, as plântulas foram colocadas em frascos de capacidade de 300 mL (6,5 cm de diâmetro e 13 cm de altura) contendo 40 ml de meio de cultura. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de  $25 \pm 2$  °C/ $18 \pm 2$  °C (dia/noite), fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . As plantas foram transplantadas para bandejas de poliestireno com 108 células (3 cm de largura e 7 cm de altura) contendo aproximadamente 30 g de substrato e mantidas em casa de vegetação com iluminação artificial de  $13 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 12 horas e temperatura de  $24 \pm 5$  °C durante o dia e  $20 \pm 5$  °C durante a noite.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial (3 x 2). Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett e análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância utilizando o programa estatístico ASSISTAT versão 7.7 beta.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 TESTE DE VIABILIDADE DE SEMENTES

A viabilidade das sementes foi semelhante após armazenamento por 24 e 30 meses na temperatura de - 20 °C, ocorrendo uma redução após 36 meses. Em relação às temperaturas testadas, após 36 meses de armazenamento, a temperatura de - 80 °C foi mais eficiente, mantendo a viabilidade das sementes elevada (81,86%), enquanto que com - 20 °C houve redução significativa (64,24%) (TABELA 1 e FIGURAS 1A, 1B). A porcentagem de sementes inviáveis na temperatura de - 20 °C foi maior à medida que aumentou o período de armazenamento e a taxa de sementes sem embrião foi baixa (menor que 3%) e semelhante nas duas temperaturas e nos três períodos de armazenamento (TABELA 1).

As sementes de *H. grandis* armazenadas na temperatura de - 20 °C apresentaram boa resposta de viabilidade (75%) para os períodos de até 30 meses de armazenamento. Apesar dessa temperatura ser indicada para armazenar sementes de orquídeas em muitos bancos de sementes convencionais (SEATON *et al.*, 2013), a de - 80 °C foi mais eficiente para *H. grandis*, pois manteve a viabilidade elevada após 36 meses de armazenamento (80%), sendo também recomendada para *Pterostylis recurva* (HAY *et al.*,

2010). Segundo Vendrame *et al.* (2014), pesquisas realizadas com sementes de várias espécies de orquídeas mostraram que a viabilidade pode ser mantida após armazenamento pelos métodos tradicionais (5% de umidade relativa e temperatura de - 20 °C). Porém, os resultados são muito variáveis dependendo do método utilizado, da espécie e do lote de sementes testado. De maneira geral, a criopreservação consiste em reduzir ao máximo o metabolismo do material vegetal e paralisar a divisão celular, o que é obtido por meio da exposição do material a temperaturas ultra-baixas, porém, as células devem manter sua estrutura intacta, o que permitirá o retorno a suas atividades normais, após o descongelamento (BAJAJ, 1995). O teor de água das sementes preservadas deverá ser baixo o suficiente para evitar a formação de cristais de gelo, mas não tão baixo que cause injúria por desidratação excessiva (SANTOS, 2001). Ainda não foi possível relacionar, claramente, a longevidade das sementes com a temperatura de armazenamento e com o teor de água das sementes (PRITCHARD e SEATON, 1993). Thornhill e Koopowitz (1992) estudando a viabilidade de armazenamento de sementes de *Disa uniflora*, sob várias condições recomendaram temperaturas iguais ou inferiores a - 70 °C para bancos de sementes. Huehne e Bhinija (2012) também constataram que a temperatura de - 70 °C melhora a longevidade de sementes de orquídeas armazenadas, desde que seja utilizado mio-inositol como agente crioprotetor. No presente estudo, foi obtido um resultado semelhante, com a temperatura de - 80 °C sendo mais eficiente do que - 20 °C, após 36 meses de armazenamento de sementes de *H. grandis*, com a vantagem de não haver necessidade do uso de um agente crioprotetor.

TABELA 1. TESTE DE VIABILIDADE DO TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE *Hadrolaelia grandis*, APÓS ARMAZENAMENTO EM TEMPERATURAS DE - 20 °C E - 80 °C POR 24, 30 E 36 MESES.

	Período de armazenamento (meses)			Média geral
	24	30	36	
Temperatura	Viáveis (%)			
- 20 °C	83,40 a A	75,40 a A	64,24 b B	74,35
- 80 °C	80,20 a A	77,60 a A	81,86 a A	79,89
Média geral	81,80	76,50	73,05	
	Inviáveis (%)			
- 20 °C	14,60 a C	21,80 a B	33,71 a A	23,37
- 80 °C	17,40 a A	19,90 a A	16,10 b A	17,80
Média geral	16,00	20,85	24,91	
	Sem embrião (%)			
- 20 °C	2,00 <sup>ns</sup>	2,80 <sup>ns</sup>	2,05 <sup>ns</sup>	2,28
- 80 °C	2,40 <sup>ns</sup>	2,50 <sup>ns</sup>	2,04 <sup>ns</sup>	2,31
Média geral	2,20	2,65	2,04	

As letras minúsculas iguais nas colunas e as letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ns= não significativo.

### 3.2 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

As sementes armazenadas a - 20 °C apresentaram maior porcentagem de germinação no meio de cultura WPM, independente do período de armazenamento. No entanto, após 36 meses de armazenamento nessa temperatura ocorreu uma perda significativa de viabilidade (TABELA 2). As melhores respostas ocorreram com o armazenamento a - 80 °C nos meios de cultura WPM e KC. Para essa temperatura, os menores valores foram obtidos após 30 meses de armazenamento (TABELA 2).

As sementes armazenadas a - 20 °C e cultivadas no meio WPM apresentaram IVG superiores aos dos outros meios testados. Os maiores valores foram obtidos nas sementes armazenadas por 30 meses (TABELA 3). No entanto, as melhores respostas de IVG foram obtidas para as sementes armazenadas a - 80 °C e os valores foram maiores com o aumento do período de armazenamento (TABELA 3), como também ocorreu com os resultados de porcentagem de germinação.



TABELA 2. GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE *Hadrolaelia grandis*, EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, APÓS ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES EM TEMPERATURAS DE - 20 °C E - 80 °C, POR 24, 30 E 36 MESES, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

Armazenamento		Germinação (Sementes com testa rompida) (%)				
		Meios de cultura				
Temperatura	Período (meses)	WPM	VW	MS	KC	Média geral
- 20 °C	24	74,40 a A	46,00 a B	30,00 b C	52,20 a B	50,65
	30	72,40 a A	24,20 b C	42,60 a B	38,60 b B	44,45
	36	35,35 b A	7,29 c B	8,60 c B	11,86 c B	15,75
Média geral		61,05	25,83	27,067	34,22	
- 80 °C	24	94,00 a A	60,80 b B	37,20 c C	88,00 a A	70,00
	30	65,20 b A	51,80 b B	53,20 b B	61,40 b AB	57,90
	36	94,71 a A	86,85 a AB	83,11 a B	90,60 a AB	88,82
Média geral		84,64	66,48	57,84	80,00	

As letras minúsculas iguais nas colunas e as letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 3. ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Hadrolaelia grandis*, CULTIVADAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, APÓS 24, 30 E 36 MESES DE ARMAZENAMENTO, EM TEMPERATURAS DE - 20 °C E - 80 °C.

Armazenamento		IVG				
		Meios de cultura				
Temperatura	Período (meses)	WPM	VW	MS	KC	Média geral
- 20 °C	24	11,40 b A	7,34 a BC	4,71 b C	8,12 a B	7,89
	30	17,05 a A	5,95 a C	8,07 a BC	9,09 a B	10,04
	36	7,97 c A	1,74 b B	2,11 b B	3,69 b B	3,88
Média geral		12,14	5,01	4,96	6,97	
- 80 °C	24	15,29 c A	9,76 c B	5,59 c C	12,64 c AB	10,82
	30	18,84 b A	15,96 b A	12,76 b B	16,68 b A	16,06
	36	25,33 a A	25,17 a A	19,40 a B	21,54 a B	22,86
Média geral		19,82	16,94	12,58	16,95	

As letras minúsculas iguais nas colunas e as letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A melhor resposta de germinação das sementes foi observada no meio de cultura WPM, sendo que após duas semanas de cultivo 51,4% das sementes apresentaram testa rompida (FIGURA 2A). No meio MS houve porcentagem de germinação inferior ao dos outros meios após quatro semanas de cultivo, com poucas sementes desenvolvendo ápices caulinares e rizóides (FIGURA 2B). As sementes dos meios KC e VW apresentaram maiores porcentagens de germinação, após seis semanas, enquanto nesse mesmo

período, as cultivadas no meio WPM atingiam os estádios mais avançados (3 e 4) (FIGURAS 2C, 2D). Após oito semanas de cultivo, 45,6% dos protocormos cultivados no meio WPM apresentavam folha (estádio 4 – FIGURA 2D). Nos demais meios de cultura (MS, KC e VW), o desenvolvimento foi mais lento com poucas sementes atingindo o estágio 4 (33,2%, 23,6% e 0,4%, respectivamente) (FIGURA 2D).

O desenvolvimento dos protocormos não ocorreu de maneira uniforme nos meios de cultura, sendo observados diferentes estádios de desenvolvimento num mesmo período e nem sempre houve o aparecimento de rizóides. As primeiras raízes foram observadas a partir da 12<sup>a</sup> semana nos meios WPM (FIGURA 1H), MS (FIGURA 1I) e KC, enquanto que no meio VW só começaram a surgir após 16 semanas de cultivo.

As sementes de *H. grandis* cultivadas no meio WPM apresentaram maior porcentagem de germinação, maior IVG e melhor desenvolvimento de plântulas. Diferentes meios de cultura geralmente são testados para a mesma espécie de orquídea e as suas formulações influenciam tanto a germinação quanto o desenvolvimento dos protocormos (DUTRA *et al.*, 2009; SUZUKI *et al.*, 2010). As formulações salinas e de compostos orgânicos dos meios de cultura variam não apenas na sua concentração, mas também nas suas formas disponíveis (ANEXOS 1, 2 e 3). Esses dois aspectos são espécie-específicos para as orquídeas e a determinação de uma composição nutricional ótima para cada espécie pode facilitar a produção em larga escala e contribuir para a conservação de espécies ameaçadas (SUZUKI *et al.*, 2012).

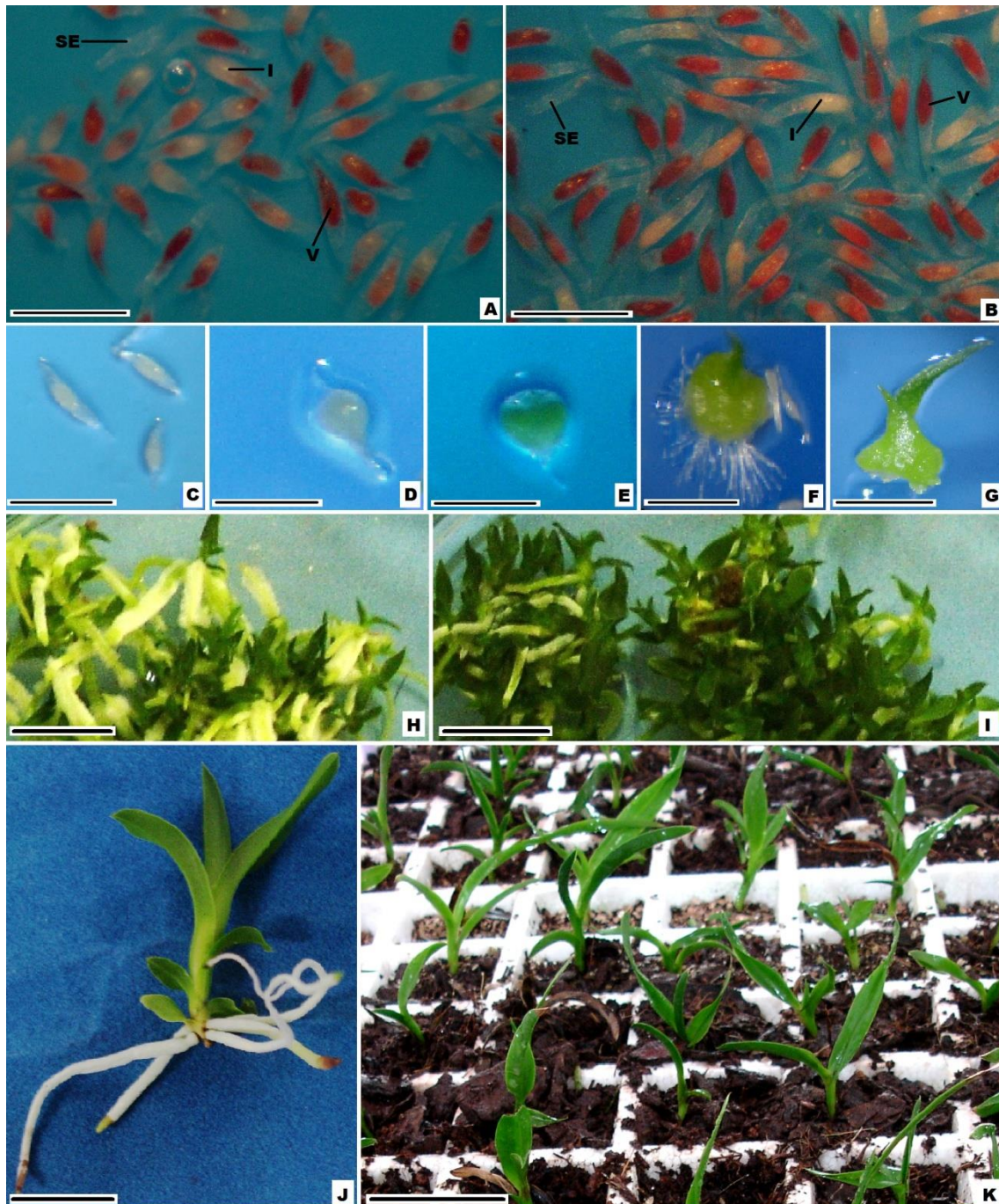


FIGURA 1. TESTE DO TETRAZÓLIO (TZ) COM SEMENTES ARMAZENADAS POR 36 MESES, GERMINAÇÃO *IN VITRO* E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Hadrolaelia grandis*. A. TZ COM SEMENTES ARMAZENADAS A - 20 °C. B. TZ COM SEMENTES ARMAZENADAS A - 80 °C. V= SEMENTE VIÁVEL, I= SEMENTE INVIÁVEL, SE= SEMENTE SEM EMBRIÃO. C. SEMENTE COM EMBRIÃO. D. SEMENTE EM ESTÁDIO INICIAL DE DESENVOLVIMENTO. E. SEMENTE COM TESTA ROMPIDA. F. PROTOCORMO COM ÁPICE CAULINAR E RIZÓIDES. G. PROTOCORMO COM FOLHA. (FIGURAS A – G. Barra: 1 mm). DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS EM MEIO DE CULTURA: H. WPM E I. MS, APÓS 24 SEMANAS DE CULTIVO (FIGURAS H – I Barra: 10 mm). J. WPM, ACRESCIDO DE CARVÃO ATIVADO. (Barra: 20 mm). K. PLÂNTULAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS (Barra: 30 mm).

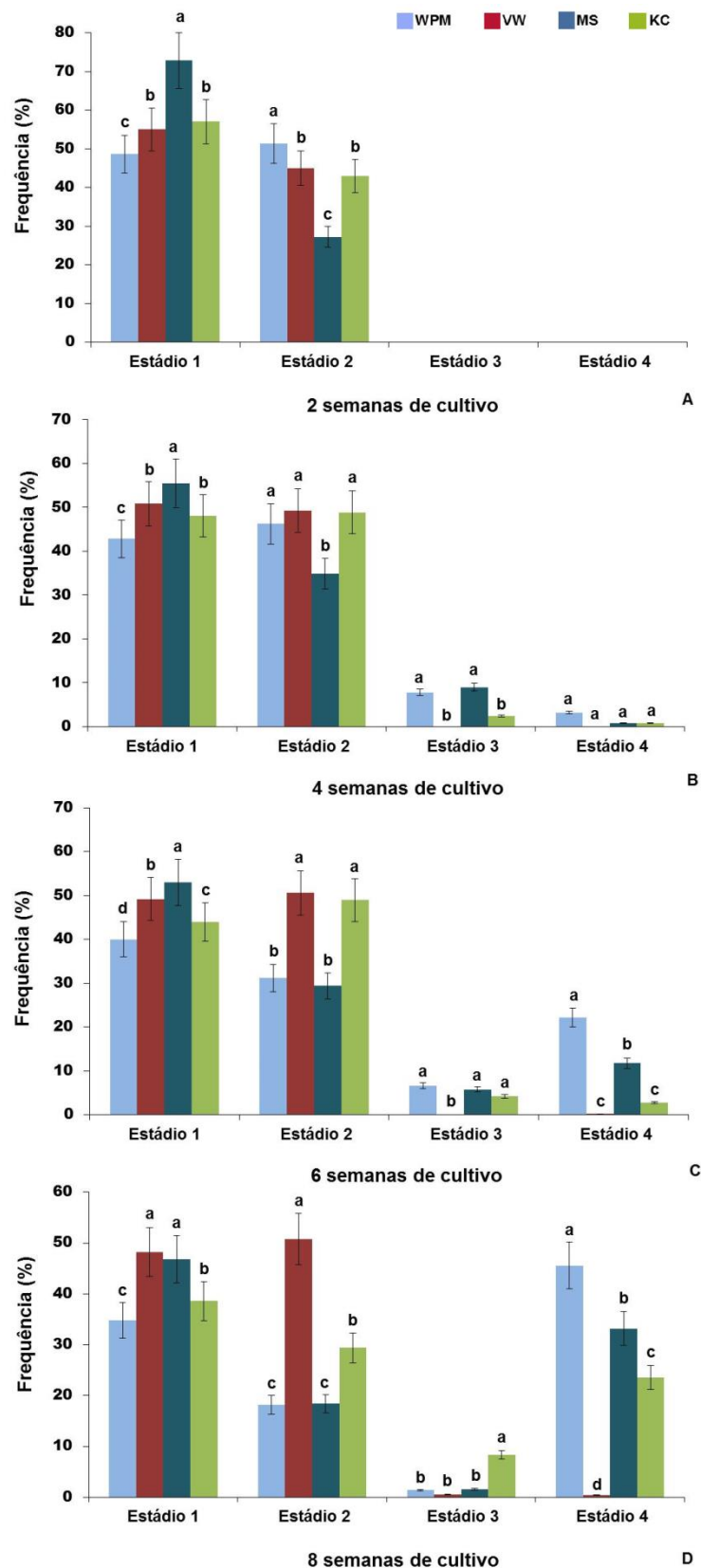


FIGURA 2. FREQUÊNCIA (%) DOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DOS PROTOCORMOS DE *Hadrolaelia grandis*, ORIUNDOS DE SEMENTES ARMAZENADAS A - 80 °C POR 30 MESES E CULTIVADOS *IN VITRO* POR DUAS, QUATRO, SEIS E OITO SEMANAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. ESTÁDIO 1: SEMENTE CONTENDO EMBRIÃO VIÁVEL, 2: SEMENTE COM TESTA ROMPIDA (GERMINAÇÃO), 3: PROTOCORMO COM ÁPICE E/OU RIZÓIDES, 4: PROTOCORMO COM FOLHA.

Baseando-se nas necessidades nutricionais apresentadas na propagação *in vitro*, Stewart (1989) classificou as orquídeas em dois grupos. No primeiro grupo foram incluídas as orquídeas que germinam facilmente em meios de cultura com composições nutricionais simples, como o KC e o VW e no segundo, as espécies que requerem meios de cultura mais ricos em macro e micronutrientes, como MS. Os resultados obtidos no presente trabalho indicaram que *H. grandis* não pode ser incluída nesses grupos, pois no meio WPM, que se caracteriza por baixa concentração de sais e suplementado de vitaminas, as porcentagens de germinação foram maiores e o desenvolvimento das plântulas foi mais rápido. Ao analisarmos as formulações de meios de cultura, a concentração de  $K^+$  no meio WPM é bem maior que nos meios KC e VW e menor que no MS. A baixa concentração deste elemento nos meios KC e VW pode ter prejudicado o desenvolvimento dos protocormos. As formulações dos meios KC e VW contêm a mesma concentração de amônio e sulfato e a de Fe é semelhante. Além disso, esses meios não contêm vitaminas, glicina e mio-inositol e a falta desses componentes pode ter colaborado para os resultados obtidos na germinação e desenvolvimento dos protocormos de *H. grandis*. A adição de várias vitaminas no meio de cultura pode promover tanto a germinação quanto o desenvolvimento dos protocormos como também ocorreu em *Cymbidium elegans* e *Coelogyne punctulata* (SHARMA *et al.*, 1991).

Outro fator importante a ser considerado é a relação nitrato/amônio dos meios de cultura. Os protocormos de *H. grandis*, germinaram melhor nos meios MS e WPM, que apresentam menor relação nitrato/amônio (0,52 e 0,51 respectivamente). Nos outros meios, essa relação é bem maior, 0,89 no KC e 1,46 no VW. A espécie estudada parece ter preferência por baixa relação

nitrito/amônio. No entanto, se considerarmos a concentração de amônio e nitrito do meio MS é bem superior à do WPM e também do KC e VW. O meio MS foi eficiente na etapa inicial da germinação das sementes de *H. grandis*, no entanto, com o tempo de cultivo foi ocorrendo mortalidade que pode ter sido ocasionada pelas concentrações muito elevadas de amônio e nitrito.

Ao contrário do que foi observado no presente trabalho, o meio WPM não se mostrou eficiente para a propagação *in vitro* de híbridos de orquídeas (*Cattleya walkeriana*, *Cattleya intermedia* e *Brassola eliacattleya*), sendo recomendado meio com altas concentrações de sais, como o MS (MIYATA *et al.*, 2014). Respostas similares foram obtidas para *Cymbidium aloifolium*, para a qual o meio MS foi melhor que KC tanto para a germinação, como para o desenvolvimento dos protocormos (PRADHAN *et al.*, 2013) e para *Vanda coerulea*, o meio MS foi mais efetivo que KC e VW na germinação (ROY *et al.*, 2011).

Para *H. grandis*, os resultados obtidos do TZ e da germinação *in vitro* foram semelhantes, indicando que essa espécie apresentou um comportamento ortodoxo. Ao compararmos a viabilidade das sementes armazenadas a - 80 °C, independente do período de armazenamento, foram obtidas 80% de sementes viáveis, enquanto que a germinação *in vitro* no meio WPM foi de 94%, após 24 e 36 meses de armazenamento. Testes de viabilidade como o do TZ e a germinação *in vitro* são importantes para avaliar a qualidade das sementes de orquídeas armazenadas em diferentes períodos e temperaturas e pequenas alterações, muitas vezes, podem ocorrer ao longo do tempo de armazenamento (HOSOMI *et al.*, 2012). No TZ, as sementes coram-se parcial ou totalmente de vermelho, e apenas as células vivas do embrião

adquirem a coloração, dificultando a diferenciação entre viáveis e inviáveis, ou seja, é difícil saber se somente as sementes totalmente coradas germinam ou se as que apresentam coloração parcial também germinam. Na germinação *in vitro*, os meios de cultura têm importante influência no poder germinativo das sementes e a escolha do meio adequado é fundamental para que todas as sementes viáveis germinem. Por isso foram testados diversos meios na germinação de *H. grandis* e a taxas de viabilidade com o TZ foram semelhantes às de germinação em WPM, que foi o meio que apresentou as melhores respostas no cultivo *in vitro*. Isto indica que WPM é o meio mais indicado para a germinação e desenvolvimento de plântulas dessa espécie. Os resultados dos testes de viabilidade e germinação também foram semelhantes para espécies de *Cattleya* (HOSOMI *et al.*, 2011), *Hoffmannseggella cinnabarina* (SUZUKI *et al.*, 2012), *Dendrobium formosum* (KANANONT *et al.*, 2010), entre outras.

### 3.3 ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO

As plântulas obtidas da germinação *in vitro*, cultivadas em meio de cultura WPM, acrescido de carvão ativado (1, 2 e 3 g L<sup>-1</sup>) apresentaram bom desenvolvimento, mas não houve diferenças significativas no número médio de raízes (8,0), comprimento das raízes (4,7 cm) e altura da parte aérea (1,6 cm) (FIGURA 1J e TABELA 4). Resultados semelhantes foram obtidos com *Brasiliidium forbesii*, em que a presença de carvão ativado, nas mesmas concentrações testadas, proporcionou o desenvolvimento de plântulas mais vigorosas (GOMES *et al.*, 2015). Segundo Moraes *et al.* (2005), o carvão ativado também melhorou a qualidade das plantas *in vitro* e a sobrevivência



após o transplântio, sendo recomendado o meio MS/2, acrescido de 2 g L<sup>-1</sup> para *Miltonia flavescens* e *Laelia flava* e 1 g L<sup>-1</sup> de *Oncidium trulliferum*. A concentração de 2 g L<sup>-1</sup> também foi recomendada para híbridos de *Dendrobium* (MARTIN e MADASSERY, 2006) e de 1 g L<sup>-1</sup> para *Oncidium tigrinum* (MATA-ROSAS *et al.*, 2011). No cultivo *in vitro*, o carvão ativado adsorve substâncias inibitórias produzidas pelo explante e liberadas no meio de cultura, assim como reguladores vegetais e outros compostos orgânicos que podem prejudicar o crescimento e o desenvolvimento das plantas (PAN e STADEN, 1998).

TABELA 4. ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE PLÂNTULAS DE *Hadrolaelia grandis* ORIUNDAS DA GERMINAÇÃO *IN VITRO*, COM 10 MESES DE IDADE, APÓS 120 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE CARVÃO ATIVADO.

Carvão ativado (g. L <sup>-1</sup> )	Número médio de raízes	Comprimento médio das raízes	Altura média da parte aérea
1	7,88±0,55	4,80±0,53	1,61±0,20
2	7,38±0,85	4,57±0,33	1,56±0,16
3	8,74±1,13	4,80±0,23	1,67±0,16
Média geral	8,00	4,72	1,61

Os valores representam as médias ± desvio padrão.

### 3.4 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO

Após 12 semanas de aclimatização em casa de vegetação, as plantas cultivadas nos diferentes substratos obtiveram porcentagens de sobrevivência elevadas (73,21% a 91,07%) e não apresentaram diferenças significativas para nenhuma das variáveis avaliadas (TABELA 5 e FIGURA 1K). Apesar de não haver diferenças estatísticas, as plantas de *H. grandis* aclimatizadas em vermiculita foram as que apresentaram as maiores porcentagens de sobrevivência, assim como ocorreu com *Anselia africana* (VASUDEVAN e STADEN (2010). Segundo FIGUEIREDO e KOLB (2013), a escolha de um substrato adequado para o transplântio de orquídeas deve considerar aspectos



econômicos, ecológicos, físicos e químicos. As orquídeas epífitas, como *H. grandis*, vivem em ambientes oligotróficos, onde a disponibilidade de água é precária, e com isso, precisam absorver água e nutrientes rapidamente, quando chove. Elas possuem diversas adaptações morfológicas, como o velame nas raízes, que auxiliam na absorção de água da chuva e da umidade do ar (ROTH-NEBELSICK, 2009). Sendo assim, o substrato ideal para orquídeas epífitas deve ter alta capacidade de retenção de água, alta porosidade, boa capacidade de drenagem e boa aeração para evitar o apodrecimento da raízes (LA CROIX, 2008).

TABELA 5. PLÂNTULAS DE *Hadrolaelia grandis*, ORIUNDAS DA GERMINAÇÃO *IN VITRO*, TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS E ACLIMATIZADAS POR 90 DIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO.

Substratos	Altura média da parte aérea (cm)	Número médio de raízes	Comprimento médio das raízes (cm)	Número médio de folhas	Massa fresca (g)	Sobrevivência (%)
PC	1,51±0,20	4,91±0,81	3,47±0,54	3,00±0,32	0,47±0,13	76,79±8,63
CPHM	1,41±0,13	4,96±0,92	3,39±0,60	2,92±0,45	0,48±0,13	73,21±24,40
PC+CPHM	1,59±0,10	5,35±0,62	3,93±0,37	2,83±0,36	0,52±0,09	75,00±14,43
PC+CPHM+V	1,55±0,19	4,73±1,07	3,43±0,46	2,98±0,26	0,49±0,11	89,29±13,36
V	1,54±0,07	5,28±0,65	3,93±0,38	3,14±0,16	0,54±0,09	91,07±6,10
Média geral	1,52	5,05	3,63	2,97	0,50	81,07

**Abreviaturas:** **PC** - Pó de coco Vitaplan®; **CPHM** - Casca de pinus com húmus de minhoca Vitaplan®; **PC+CPHM** - Pó de coco + casca de pinus com húmus de minhoca (1:1); **PC+CPHM+V** - Pó de coco + casca de pinus com húmus de minhoca + vermiculita (1:1:1); **V** - Vermiculita Eucatex®. Os valores representam as médias ± desvio padrão.

#### 4 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos nesse estudo foi possível estabelecer um protocolo de conservação e propagação *in vitro* de *H. grandis*. Recomenda-se a temperatura de - 80 °C para o armazenamento de sementes e o meio de WPM para a germinação *in vitro* e desenvolvimento dos protocormos. As plântulas apresentam crescimento e enraizamento vigoroso em meio WPM,

com adição de  $1 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado e a vermiculita é o substrato mais indicado para transplante e aclimatização.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, D.; ARAÚJO, S. **Orquídeas Brasileiras**. Campinas: MM Comunicação Ltda, 2008. 225 p.
- ARDITTI, J., ERNST, R. **Micropropagation of Orchids**. New York: John Wiley & Sons, 1993. 682 p.
- BAJAJ, Y.P.S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: BAJAJ, Y.P.S. ed. Cryopreservation of plant germplasm. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 32, 1995. p. 3-28.
- BARROS, F. DE; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. Orchidaceae: In **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB64706>>. Acesso em: 07 Out. 2015.
- DUTRA, D.; KANE, M. E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 96, n. 3, 235-243, 2009.
- FERREIRA, W. M.; SUZUKI, R. M. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: Loiola, M. I.; BASEIA, I. G.; LICHSTON, J. E. (Org.) **Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil**. Natal: Imagem Gráfica, p.67-68, 2008.
- FIGUEIREDO, L.D.; KOLB, R.M. Novo substrato para o cultivo de orquídeas: estudo do seu potencial de uso em plantas de *Laelia pulcherrima*. **Revista Brasileira de Biociências**, v.11, p. 405-413, 2013.
- GOMES, L. R. P.; FRANCESCHI, C. D. R. B.; RIBAS, L. L. F. Micropropagation of *Brasilidium forbesii* (Orchidaceae) through transverse and longitudinal thin cell layer culture. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, n. 2, p. 143-149, 2015.
- HAY, F.R.; MERRITT, D.J.; SOANES, J.A.; DIXON, K.W. Comparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature storage conditions. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 164, p. 26-41, 2010.
- HOSOMI, S.T.; SANTOS, R.B.; CUSTÓDIO, C.C.; SEATON, P.T.; MARKS, T.R.; MACHADO-NETO, N.B. Pre-conditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science and Technology**, v. 139, p. 178-189, 2011.

HOSOMI, S. T.; CUSTODIO, C.C.; SEATON, P. T.; MARKS, T. R.; MACHADO-NETO, N. B. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.48, n. 1, p. 127-136, 2012.

HUEHNE, P. S.; BHINIJA, K. Application of cryoprotectants to improve low temperature storage survival of orchid seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 135, p.186-193, 2012.

KANANONT, N.; PICHYANGKURA, R.; CHANPRAME, S.; CHADCHAWAN, S.; LIMPANAVECH, P. Chitosan specificity for the *in vitro* seed germination of two *Dendrobium* orchids (Asparagales: Orchidaceae). **Scientia Horticulturae**, v. 124, n. 2, p. 239-247, 2010.

KAUTH, P.J.; DUTRA, D.; JOHNSON, T.R.; STEWART, S.L.; KANE, M.E.; VENDRAME, W.A. In: TEIXEIRA DA SILVA, J.A. (Ed.) *Techniques and applications of in vitro orchid seed germination*. Isleworth: Global Science Books, 2008. p. 375-391.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**. v. 14, p. 214-217, 1946.

LA CROIX, I.F. **The New Encyclopedia of Orchids: 1.500 species in cultivation**. First Edition, London, Timberpress Inc., 2008. 524 p.

LLOYD, G.; McCOWN, B. H. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society**, v. 30, p.421-427, 1980.

MACEDO, M.C.; ROSA, D.B.C.J.; SOARES, J.S.; TATARA, M.B.; HOFMMANN, N.T.K.; ROSA, Y.B.C.J. Armazenamento de sementes e aclimatização de *Brassavola tuberculata* Hook. **Semina**, v. 35, p. 2883-2894, 2014.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seeding emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2 p. 176-177, 1962.

MARTIN, K. P.; MADASSERY, J. Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm - like bodies. **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 95 - 99, 2006.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. Livro vermelho da flora do Brasil. Tradução Flávia Anderson, Chris Hieatt. - 1. ed. - Rio de Janeiro : Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

MATA-ROSAS, M.; BALTAZAR-GARCIA, R. J.; CHAVEZ-AVILA, V. M. *In vitro* regeneration through direct organogenesis from protocorms of *Oncidium tigrinum* Llave e Lex. (Orchidaceae), endemic and threatened mexican species. **HortScience**, v. 46, n. 8, p. 1132-1135, 2011.

MIYATA, L.Y.; VILLA, F.; PASQUAL, M. Meios de cultura utilizados na micropropagação de híbridos de orquídeas. **Semina**, v. 35, p. 1731-1738, 2014.

MORAES, L.M.; CAVALCANTE, L.C.D.; FARIA, R.T. Substratos para aclimatização de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 24, p. 1397-1400, 2002.

MORAES, L.; FARIA, R. T.; CUQUEL, F. L. Activated charcoal for *in vitro* propagation of Brazilian orchids. **Acta Horticulturae**, v. 683, n. 2, p. 383-390, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.

PAN, M. J.; VAN STADEN, J. The use of charcoal *in vitro* culture – a review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, n. 3, p.155-163, 1998.

PRADHAN, S.; REGMI, T.; PARMAR, G.; PANT, B. Effect of Different Media on *in vitro* Seed Germination and Seedling Development of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. **Nepal Journal of Science and Technology**, v. 14, n. 1, p. 51-56, 2013.

PRITCHARD, H. W.; SEATON, P. T. Orchid seed storage: historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. **Selbyana**, p. 89-104, 1993.

ROTH-NEBELSICK, A. Pull, push and evaporate: the role of surfaces in plant water transport. In: **Functional surfaces in biology**. Netherlands: Springer, 2009. p. 141-159.

ROY, A. R.; PATEL, R. S.; PATEL, V. V.; SAJEEV, S.; DEKA, B. C. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl.(Blue Vanda): an *in vitro* protocol for an endangered orchid. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 3, p. 325-331, 2011.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 20, p. 60-65, 2001.

SARASAN, V.A.; CRIPPS, R.; RAMSAY, M.M.; ATHERTON, C.; MCMICHEN, M.; PRENDERGAST, G.; ROWNTREE, J.K. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant.**, v.42, p.206 - 214, 2006.

SATHYANARAYANA, B. N.; VARGHESE, D. B. **Plant tissue culture: practices and new experimental protocols**. Nova Deli, Índia: I K International Publishing House, 2007. 292 p.

SEATON, P.; KENDON, J.P.; PRITCHARD, H.W.; PUSPITANINGTYAS, D.M.; MARKS, T.R. Orchid conservation: the next ten years. **Lankesteriana**, v. 13, p. 93-101, 2013.

SEATON, P.; RAMSAY, M. M. **Growing orchids from seed**. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 2005. 96 p.

SORACE, M.; FARIA, R.T.; FONSECA, I.C.B.; YAMOTO, L.Y.; SORACE, M.A.F. Substratos alternativos ao xaxim no cultivo do híbrido *Cattleya intermedia* X *Hadrolaelia purpurata* (Orchidaceae). **Semina**, v. 30. p. 771-778, 2009.

STEWART, J. Orchid propagation by tissue culture techniques-past, present and future. **Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management**. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 87-100, 1989.

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, v. 37, n. 4, p. 731-742, 2010.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. **In Vitro Cellular & Development Biology - Plant**, v. 48, p. 500-511, 2012.

SWARTS, N.D.; DIXON, K.W. Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 590–598, 2009.

THORNHILL, A.; KOOPOWITZ, H. Viability of *Disa uniflora* Berg (Orchidaceae) seeds under variable storage conditions: Is orchid gene-banking possible?. **Biological conservation**, v. 62, n. 1, p. 21-27, 1992.

VACIN, E.F.; WENT, E.W. Some pH in nutrient solutions. **Botanical Gazeta**, v.110, p. 605-617, 1949.

VASUDEVAN, R.; VAN STADEN, J. *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. **Scientia horticultrae**, v. 123, n. 4, p. 496-504, 2010.

VENDRAME, W.; FARIA, R. T; SORACE, M.; SAHYUN, S. A. Orchid Cryopreservation. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 3, p. 213-229, 2014.

YAN, N.; HU, H.; HUANG, J.; XU, K.; WANG, H.; ZHOU, Z. Micropropagation of *Cypripedium flavum* through multiple shoots of seedlings derived from mature seeds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 84, p. 113-117, 2006.

## ANEXOS

ANEXO 1. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA GERMINAÇÃO DE *Hadrolaelia grandis*.

Componentes (mg L <sup>-1</sup> )	KC	MS	VW*	WPM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500	-	500	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	250	370	122,09	370
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	990
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	440	-	96
KNO <sub>3</sub>	-	1900	525	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1000	-	-	556
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	1650	-	400
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250	170	250	170
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	25	27,3	-	27,8
FeC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	-	26,3	-
Na <sub>2</sub> EDTA	-	37,3	-	33,6
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	22,3	-	-
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	7,5	-	5,68	22,3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,331	8,6	-	8,6
MoO <sub>3</sub>	0,016	-	-	-
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0624	0,025	-	0,25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	0,025	-	-
KI	-	0,83	-	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,056	6,2	-	6,2
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	0,25	-	0,25
Mio-inositol	-	100	-	100
Ácido Nicotínico	-	0,5	-	0,5
Piridoxina HCl	-	0,5	-	0,5
Tiamina HCl	-	0,1	0,4	1,0
Glicina	-	2,0	-	2,0
Sacarose	30000	30000	20000	30000
Ágar	5600	5600	8000	5600

\*formulação comercial Himedia®

## ANEXO 2. COMPOSIÇÃO IÔNICA DOS MACRONUTRIENTES NOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA GERMINAÇÃO.

Macronutriente (mM)	Meio de cultura			
	KC	MS	VW	WPM
Potássio (K <sup>+</sup> )	1,8	20,0	6,9	12,6
Cálcio (Ca <sup>2+</sup> )	4,2	3,0	1,9	3,0
Magnésio (Mg <sup>2+</sup> )	1,0	1,5	1,0	1,5
Amônio (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	7,6	20,6	7,6	4,9
Nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	8,4	39,4	5,2	9,6
Sulfato (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	4,8	1,7	4,9	7,4
Fosfato (PO <sub>4</sub> )	1,8	1,3	3,1	1,31
Nitrogênio total	16,0	60,0	12,8	14,5
Relação NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,89	0,52	1,46	0,51

### ANEXO 3. COMPOSIÇÃO DOS MICRONUTRIENTES NOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA GERMINAÇÃO

Micronutriente (µM)	Meio de cultura			
	KC	MS	VW	WPM
Ferro (Fe)	90,00	110,00	95,00	110,00
Sódio (Na <sup>+</sup> )	-	0,20	-	0,20
Cloro (Cl <sup>-</sup> )	-	6,00	-	0,10
Manganês (Mn)	44,40	132,00	-	132,00
Zinco (Zn)	1,15	29,00	-	30,00
Iodo (I)	-	5,00	-	-
Cobre (Cu)	0,25	0,10	-	1,00
Cobalto (Co)	-	0,10	-	-
Molibdênio (Mo)	0,11	1,00	-	1,10

### ANEXO 4. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO TESTE DO TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE *Hadrolaelia grandis*, APÓS ARMAZENAMENTO EM TEMPERATURAS DE - 20 ° C E - 80 ° C POR 24, 30 E 36 MESES.

Fontes de variação	Sementes viáveis (%)		
	GL	QM	F
Temperaturas de armazenamento	1	138,13990	8,1213 *
Períodos de armazenamento	2	116,51125	6,8498 *
Temperaturas de armazenamento x Períodos de armazenamento	2	175,06686	10,2923 **
Tratamentos	5	144,25923	8,4811 **
Erro experimental	12	17,00951	
Total	17		
Coeficiente de variação (%)	5,35		

Fontes de variação	Sementes inviáveis (%)		
	GL	QM	F
Temperaturas de armazenamento	1	139,55636	14,5213 **
Períodos de armazenamento	2	119,39684	12,4237 **
Temperaturas de armazenamento x Períodos de armazenamento	2	171,40741	17,8356 **
Tratamentos	5	144,23297	15,0080 **
Erro experimental	12	9,61043	
Total	17		
Coeficiente de variação (%)	15,06		

Fontes de variação	Sementes sem embrião (%)		
	GL	QM	F
Temperaturas de armazenamento	1	0,00436	0,0222 <sup>ns</sup>
Períodos de armazenamento	2	0,59509	3,0299 <sup>ns</sup>
Temperaturas de armazenamento x Períodos de armazenamento	2	0,18536	0,9437 <sup>ns</sup>
Tratamentos	5	0,31305	1,5939 <sup>ns</sup>
Erro experimental	12	0,19641	
Total	17		
Coeficiente de variação (%)	19,19		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0,01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (p < 0,05)

<sup>ns</sup> não significativo (p >= 0,05)



ANEXO 5. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE *Hadrolaelia grandis*, EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, APÓS ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES EM TEMPERATURAS DE - 20 °C E - 80 °C, POR 24, 30 E 36 MESES, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

Fontes de variação	Sementes armazenadas a - 20 °C		
	GL	QM	F
Períodos de armazenamento	2	4195,24750	344,3620 **
Meios de cultura	3	2428,69190	199,3563 **
Períodos de armazenamento x meios de cultura	6	192,48090	15,7996 **
Tratamentos	11	1530,13237	125,5991 **
Erro experimental	24	12,18267	
Total	35		
Coeficiente de variação (%)	9,42		

Fontes de variação	Sementes armazenadas a - 80 °C		
	GL	QM	F
Períodos de armazenamento	2	2912,96601	137,1809 **
Meios de cultura	3	1363,57989	64,2154 **
Períodos de armazenamento x meios de cultura	6	448,06122	21,1006 **
Tratamentos	11	1145,91264	53,9647 **
Erro experimental	24	21,23448	
Total	35		
Coeficiente de variação (%)	6,38		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ )

ANEXO 6. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Hadrolaelia grandis*, CULTIVADAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, APÓS 24, 30 E 36 MESES DE ARMAZENAMENTO, EM TEMPERATURAS DE - 20 °C E - 80 °C.

Fontes de variação	Sementes armazenadas à - 20 °C		
	GL	QM	F
Períodos de armazenamento	2	117,41678	64,9618 **
Meios de cultura	3	102,71167	56,8261 **
Períodos de armazenamento x meios cultura	6	7,60224	4,2060 **
Tratamentos	11	53,50745	29,6034 **
Erro experimental	24	1,80747	
Total	35		
Coeficiente de variação (%)	18,49		

Fontes de variação	Sementes armazenadas à - 80 °C		
	GL	QM	F
Períodos de armazenamento	2	437,26080	228,3721 **
Meios de cultura	3	80,27436	41,9256 **
Períodos de armazenamento x meios cultura	6	7,82609	4,0874 **
Tratamentos	11	105,66375	55,1859 **
Erro experimental	24	1,91469	
Total	35		
Coeficiente de variação (%)	8,35		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ )

ANEXO 7. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA FREQUÊNCIA (%) DOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DOS PROTOCORMOS DE *Hadrolaelia grandis*, ORIUNDOS DE SEMENTES ARMAZENADAS A - 80 °C POR 30 MESES E CULTIVADOS *IN VITRO* POR DUAS, QUATRO, SEIS E OITO SEMANAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.

Fontes de variação	Duas semanas		
	GL	QM	F
Estádios de desenvolvimento	3	0,00000	0,0000 **
Meios de cultura	3	10557,78000	5824,9821 **
Estádios de desenvolvimento x meios cultura	9	211,27333	116,5646 **
Tratamentos	15	2238,32000	1234,9352 **
Erro experimental	32	1,81250	
Total	47		
Coeficiente de variação (%)	5,39		

Fontes de variação	Quatro semanas		
	GL	QM	F
Estádios de desenvolvimento	3	0,00000	0,0000 **
Meios de cultura	3	7810,42000	2829,2216 **
Estádios de desenvolvimento x meios cultura	9	93,96667	34,0382 **
Tratamentos	15	1618,46400	586,2672 **
Erro experimental	32	2,76062	
Total	47		
Coeficiente de variação (%)	6,65		

Fontes de variação	Seis semanas		
	GL	QM	F
Estádios de desenvolvimento	3	0,00255	0,0009 **
Meios de cultura	3	5491,08755	1867,4853 **
Estádios de desenvolvimento x meios cultura	9	267,78089	91,0706 **
Tratamentos	15	1258,88655	428,1396 **
Erro experimental	32	2,94036	
Total	47		
Coeficiente de variação (%)	6,86		

Fontes de variação	Oito semanas		
	GL	QM	F
Estádios de desenvolvimento	3	0,00000	0,0000 **
Meios de cultura	3	3178,16000	1147,8682 **
Estádios de desenvolvimento x meios cultura	9	655,09333	236,6026 **
Tratamentos	15	1028,68800	371,5352 **
Erro experimental	32	2,76875	
Total	47		
Coeficiente de variação (%)	6,66		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ )

ANEXO 8. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE PLÂNTULAS DE *Hadrolaelia grandis* ORIUNDAS DA GERMINAÇÃO *IN VITRO* EM WPM (CONTROLE) E WPM ACRESCIDO DE CARVÃO ATIVADO(1; 2 E 3 g. L<sup>-1</sup>) APÓS 120 DIAS DE CULTIVO.

Fonte de variação	Número médio de raízes		
	GL	QM	F
Tratamentos	2	2,36600	3,0901 <sup>ns</sup>
Erro experimental	12	0,76567	
Total	14		
Coeficiente de variação (%)	10,94		

Fonte de variação	Comprimento médio das raízes (cm)		
	GL	QM	F
Tratamentos	2	0,08515	0,5794 <sup>ns</sup>
Erro experimental	12	0,14697	
Total	14		
Coeficiente de variação (%)	8,12		

Fonte de variação	Altura média da parte aérea (cm)		
	GL	QM	F
Tratamentos	2	0,01353	0,4379 <sup>ns</sup>
Erro experimental	12	0,03089	
Total	14		
Coeficiente de variação (%)	10,89		

<sup>ns</sup> não significativo (p >= 0,05)

9. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE PLANTAS DE *Hadrolaelia grandis* ORIUNDAS DA GERMINAÇÃO *IN VITRO* TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS E ACLIMATIZADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO APÓS 12 SEMANAS DE CULTIVO.

Fontes de variação		Altura média da parte aérea (cm)		
		GL	QM	F
Tratamentos		4	0,03134	1,4083 <sup>ns</sup>
Erro experimental		30	0,02225	
Total		34		
Coeficiente de variação (%)	9,81			

Fontes de variação		Número médio de raízes		
		GL	QM	F
Tratamentos		4	0,48514	0,7044 <sup>ns</sup>
Erro experimental		30	0,68870	
Total		34		
Coeficiente de variação (%)	16,44			

Fontes de variação		Comprimento médio das raízes (cm)		
		GL	QM	F
Tratamentos		4	0,53434	2,3189 <sup>ns</sup>
Erro experimental		30	0,23042	
Total		34		
Coeficiente de variação (%)	13,22			

Fontes de variação		Número médio de folhas		
		GL	QM	F
Tratamentos		4	0,08848	0,8403 <sup>ns</sup>
Erro experimental		30	0,10530	
Total		34		
Coeficiente de variação (%)	10,9			

Fontes de variação		Massa fresca (g)		
		GL	QM	F
Tratamentos		4	0,00730	0,5877 <sup>ns</sup>
Erro experimental		30	0,01243	
Total		34		
Coeficiente de variação (%)	22,26			

Fontes de variação		Sobrevivência (%)		
		GL	QM	F
Tratamentos		4	517,85714	3,6250 *
Erro experimental		30	142,85714	
Total		34		
Coeficiente de variação (%)	14,18			

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )

<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ )

## Capítulo II

### Micropropagação de *Hadrolaelia grandis* (Lindley & Paxton) Chiron & V. P. Castro pela técnica “thin cell layer” (TCL)

#### RESUMO

*Hadrolaelia grandis* encontra-se ameaçada de extinção e sua população está em declínio devido às coletas para fins ornamentais e destruição do habitat. O objetivo desse trabalho foi estabelecer um protocolo de propagação massal de mudas de *H. grandis* utilizando a técnica TCL. Secções transversais (TCLts) e longitudinais (TCLls) foram realizadas em protocormos com 60 e 90 dias de idade. Os explantes foram cultivados em meio Woody Plant Medium (WPM), acrescido de 6-benzilaminopurina (BAP): 1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6  $\mu\text{M}$ , além do controle, sem regulador vegetal. O alongamento e enraizamento de estruturas semelhantes a protocormos (“protocorm-like bodies” – PLBs) foi induzido em meio contendo carvão ativado (0; 1; 2 e 3  $\text{g L}^{-1}$ ) ou ácido indol-3-butírico (AIB) (0,0; 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0  $\mu\text{M}$ ). As mudas foram transplantadas em bandejas contendo: pó de coco, casca de pinus com húmus de minhoca e vermiculita. A idade do protocormo e concentração de BAP influenciaram as respostas de regeneração de PLBs. Para a técnica TCLt recomendou-se secções de protocormos de 60 dias cultivadas em meio WPM, acrescido de 2,2  $\mu\text{M}$  de BAP (70,8% de regeneração de PLBs e 30,1 PLBs por explante). A técnica TCLl foi mais eficiente com secções de protocormos de 90 dias e adição de 8,8  $\mu\text{M}$  de BAP (83,3% de regeneração de PLBs e 34,4 PLBs por explante). O carvão ativado foi eficiente no alongamento e enraizamento, sendo recomendada a concentração de 1  $\text{g L}^{-1}$ . As mudas foram aclimatizadas com sucesso em casa de vegetação (98,21% de sobrevivência) utilizando vermiculita como substrato.

**Palavras chave:** protocormo, “protocorm-like bodies” (PLBs), 6-benzilaminopurina (BAP), carvão ativado, ácido indol-3-butírico (AIB).

## CHAPTER II

### Micropropagation of *Hadrolaelia grandis* (Lindley & Paxton) Chiron & V. P. Castro through thin cell layer (TCL)

#### ABSTRACT

*Hadrolaelia grandis* is an endangered species and its population is declining due to collection for ornamental purposes and habitat destruction. The aim of this study was to establish a protocol for mass propagation of seedlings *H. grandis* using the TCL technique. Transverse (TCLts) and longitudinal (TCLls) sections were held in protocorm 60 and 90 days after germination. The explants were cultured in Woody Plant Medium (WPM), supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP): 1.1, 2.2, 4.4, 8.8 and 17.6  $\mu\text{M}$ , and in the control medium, without plant growth regulator. The elongation and rooting of PLBs were induced in medium containing activated charcoal (0, 1, 2 and 3  $\text{g L}^{-1}$ ) or indole-3-butyric acid (AIB) (0.0, 1.25, 2.5, 5.0 and 10.0  $\mu\text{M}$ ). The seedlings were transplanted in trays containing: coconut powder, pine bark with humus worm and vermiculite. The age of protocorm and concentration of BAP influenced PLBs regeneration responses. For tTCL technique protocorm sections from 60 day-old plant cultured in WPM, supplemented with 2.2  $\mu\text{M}$  BAP (70.8% of PLBs regeneration and 30.1 PLBs per explant). The ITCL technique was more efficient with sections from 90 day-old protocorms in medium containing 8.8  $\mu\text{M}$  BAP (83.3% of PLBs and 34.4 regeneration PLBs per explant). The activated charcoal was effective for elongation and rooting, and we recommended the concentration of 1  $\text{g L}^{-1}$ . The seedlings were acclimatized in a greenhouse (98.21% survival) using vermiculite as substrate.

**Keywords:** protocorm, protocorm-like bodies (PLBs), 6-benzylaminopurine (BAP), activated charcoal, indole-3-butyric acid (IBA).

## 1 INTRODUÇÃO

*Hadrolaelia grandis* é uma orquídea epífita, muito apreciada como planta ornamental pela beleza de suas flores, que são grandes, com pétalas e sépalas de coloração amarela-bronze, com lobo central do labelo rosa e lobos laterais brancos (ARAÚJO e ARAÚJO, 2008). É uma espécie endêmica da Mata Atlântica, dos estados da Bahia e Espírito Santo (BARROS *et al.*, 2010) e consta no Livro Vermelho da Flora do Brasil como vulnerável devido ao declínio populacional decorrente de coletas para fins ornamentais e da destruição do habitat (MARTINELLI e MORAES, 2013). A eminente extinção de várias espécies de orquídeas não se deve apenas à crescente exploração, mas também à dificuldade e lentidão de propagação na natureza (JUNGHANS e SOUZA, 2009).

Como as orquídeas, em geral, produzem sementes muito pequenas e desprovidas de endosperma, a propagação pelos métodos tradicionais resulta em pouco sucesso, visto que a germinação em condições naturais é menor que 5% e todas as espécies dependem de associações micorrízicas para a germinação das sementes e o estabelecimento do protocormo em seu ambiente natural (ARDITTI e ERNEST, 1993). As técnicas de cultura de tecidos *in vitro* têm sido uma alternativa de sucesso amplamente utilizada na propagação de diversas espécies de orquídeas tanto terrestres quanto epífitas (DIAZ e ALVAREZ, 2009). Essas técnicas possibilitam a propagação massal de orquídeas de interesse econômico, produzindo mais rapidamente plantas com maior vigor, melhor qualidade fitossanitária e com boa adaptação ao cultivo *ex vitro* (NHUT *et al.*, 2003; TEIXEIRA DA SILVA, 2003).

A técnica “thin cell layer” (TCL) vem sendo utilizada com sucesso na propagação massal de orquídeas. Essa técnica consiste de finos cortes com poucas camadas de células contendo um ou mais tipos de tecidos. Os cortes podem ser feitos em sentido longitudinal (TCLI) ou transversal (TCLt) e diferentes órgãos da planta podem ser utilizados como fonte de explantes (TEIXEIRA DA SILVA, 2010). Em orquídeas, os protocormos têm sido utilizados com sucesso como fonte de explantes de TCL para *Dendrobium gratiosissimum* (JAIPHET e RANGSAYATORN, 2010), *Epidendrum secundum* (FERREIRA *et al.*, 2015) e *Brasilidium forbesii* (GOMES *et al.*, 2015). Esses explantes têm alta capacidade de regenerar estruturas com características gerais de crescimento e estrutura semelhantes à protocormos (“protocorm-like bodies”- PLBs). Lee *et al.* (2013) realizaram estudos ontogenéticos detalhados e observaram que durante os primeiros estádios de formação dos PLBs, as células apresentaram características citológicas e marcadores da parede celular semelhantes às do embriões zigóticos, comprovando com isso, que os PLBs são embriões somáticos em orquídeas.

Citocininas isoladas ou combinadas com auxinas têm importante papel na indução e regeneração de PLBs (NOVAK *et al.*, 2014). Entre as citocininas, a 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido eficiente para diversas espécies de orquídeas como: *Dendrobium candidum* (ZHAO *et al.*, 2007), *Dendrobium draconis* (RANGSAYATORN, 2009), *Coelogyne cristata* (NAING *et al.*, 2011), *Dendrobium primolimum* (PANT e THAPA, 2012), *Eclipta alba* (SINGH *et al.*, 2012), *Vanda coerulea* (ROY *et al.*, 2011), *Brasilidium forbesii* (GOMES *et al.*, 2015), entre outras.



Os PLBs regenerados são separados e cultivados em meio de cultura com adição de carvão ativado ou auxinas para estimular o alongamento e desenvolvimento de raízes. O carvão ativado foi eficiente para induzir o enraizamento de *Dendrobium* sp. (MARTIN e MADASSERY, 2006), *Cattleya harrisoniana* (SCHNEIDERS *et al.*, 2012) e *Brasilidium forbesii* (GOMES *et al.*, 2015), enquanto que o ácido indol-3-butírico (AIB) induziu raízes de diversas espécies de orquídeas, como *Satyrium nepalense* (MAHENDRAN e BAI, 2009), *Cymbidium faberi* (TAO *et al.*, 2011), *Dendrobium sabin* (RAFIQUE *et al.*, 2012), *Dendrobium nobile* (MOHANTI *et al.*, 2012a), *Cymbidium mastersii* (MOHANTI *et al.*, 2012b), *Vanda testacea* (SEBASTINRAJ *et al.*, 2014) e *Cattleya* sp. (DEWIR *et al.*, 2015).

As mudas enraizadas são transplantadas e aclimatizadas em casa de vegetação. O xaxim foi muito utilizado como substrato para o transplântio de orquídeas, mas devido ao extrativismo desenfreado, está ameaçado de extinção (FIGUEIREDO e KOLB, 2013), sendo substituído por substratos alternativos, como fibra e pó de coco, casca de pínus e vermiculita (COLOMBO *et al.*, 2005; LAUZER *et al.*, 2007; LONE *et al.*, 2008 e ANTONIETTI *et al.*, 2014).

O objetivo desse trabalho foi estabelecer um protocolo de propagação massal de mudas de *Hadrolaelia grandis* utilizando a técnica TCL, a partir de protocormos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 LOCAL DE ESTUDO**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

## 2.2 MATERIAL VEGETAL

Protocormos cultivados *in vitro* com espessura de aproximadamente 1 mm, obtidos após 60 e 90 dias da germinação em meio de cultura WPM foram utilizados como fonte de explantes. Os ápices dos protocormos foram removidos e foram realizadas duas secções transversais (TCLt) e longitudinais (TCLI) com espessura de 0,5 mm.

## 2.3 TCLts E TCLIs DE PROTOCORMOS

Os protocormos foram seccionados transversalmente (TCLts) dividindo-os em região apical e basal, sendo que a basal foi colocada com o corte para cima, devido à polaridade do material vegetal e a apical com o corte em contato com o meio de cultura. Os protocormos foram divididos ao meio (TCLIs) em duas partes iguais e ambas foram colocadas com a região do corte em contato com o meio de cultura. Os TCLs foram inoculados em placas de Petri (150 mm de diâmetro e 20 mm de altura) contendo 40 mL do meio de cultura WPM, acrescido de: 1,1; 2,2; 4,4; 8,8; 17,6  $\mu$ M de BAP e um controle, sem regulador vegetal. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo que em cada placa de Petri foram cultivados 20 TCLts de cada região (apical e basal), com três repetições, totalizando 60 explantes por tratamento. Para TCLI foram cultivados 20 explantes por placa e três repetições.

Para os experimentos de TCL foram realizados dois subcultivos no meio de cultura WPM, contendo a mesma concentração de BAP do cultivo inicial. As avaliações foram realizadas após 60 dias do cultivo inicial e dos dois subcultivos consecutivos. As variáveis analisadas foram: porcentagem de explantes com regeneração de PLBs e número médio de PLBs formados por explante.

## 2.4 ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO

PLBs obtidos de TCLs dos protocormos, medindo aproximadamente 0,5 cm de comprimento foram inoculados em frascos (6,2 cm de diâmetro e 12,5 cm de altura) contendo 40 mL do meio de cultura WPM, acrescido de: 1; 2 e 3 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado ou de 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0 µM de AIB, além do controle (WPM sem carvão ativado e sem AIB). Foram inoculados seis PLBs por frasco e 10 repetições, totalizando 60 PLBs por tratamento. Após 60 dias do cultivo inicial foi realizado um subcultivo (60 dias) para meio com a mesma concentração de carvão ativado e AIB. Após o subcultivo foram avaliadas as seguintes variáveis: massa fresca (g), número médio de raízes, comprimento médio das três maiores raízes (cm) e altura média da parte da aérea das plantas (cm).

## 2.5 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O meio de cultura WPM (LLOYD e MC COWN, 1980) foi suplementado com 5,6 g L<sup>-1</sup> de ágar Himedia® e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N, antes da adição do ágar e os meios de cultura foram esterilizados a 121 °C por 20 minutos.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}/18 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (dia/noite), fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

## 2.6 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO

As mudas, com altura da parte aérea de aproximadamente 1 cm, foram transplantadas para bandejas de poliestireno com 108 células (3 cm de largura e 7 cm de altura) contendo aproximadamente 30 g de substrato. Os substratos utilizados foram: 1 - pó de coco; 2 - casca de pinus com húmus de minhoca; 3 - pó de coco + casca de pinus com húmus de minhoca + vermiculita (1:1:1) e 4 - vermiculita. Foram plantadas oito plantas e sete repetições, totalizando 56 plantas por substrato. A irrigação foi realizada manualmente a cada dois dias e após 60 dias de aclimatização em casa de vegetação foi avaliada a porcentagem de sobrevivência. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com iluminação artificial (intensidade luminosa de  $13 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), fotoperíodo de 12 horas e temperatura de  $24 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante o dia e  $20 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante a noite.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett e análise de variância (ANOVA). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico ASSISTAT versão 7.7 beta.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 TCLts DE PROTOCORMOS COM 60 DIAS DE IDADE

A região do protocormo e a concentração de BAP influenciaram as respostas de regeneração de PLBs (TABELA 1, ANEXOS 1, 2 e 3). A porcentagem de regeneração da região apical do protocormo foi maior do que a basal somente no cultivo inicial (FIGURA 1A). Os explantes cultivados em

TABELA 1. PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs E NÚMERO MÉDIO DE PLBs EM TCLts ORIUNDAS DE PROTOCORMOS DE *Hadrolaelia grandis* COM 60 DIAS DE IDADE, APÓS UM CULTIVO INICIAL (60 DIAS), PRIMEIRO SUBCULTIVO (60 DIAS) E SEGUNDO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO DE CULTURA WPM (CONTROLE) E ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6  $\mu$ M) .

Cultivo inicial (60 dias)						
Tratamentos	Explantes que regeneraram PLBs (%)			Número médio de PLBs		
BAP ( $\mu$ M)	Apical	Basal	Média geral	Apical	Basal	Média geral
0	76,7	50,0	63,3 a	3,4	7,1	5,2 a
1,1	38,33	46,7	42,5 ab	5,7	9,0	7,3 a
2,2	71,7	45,0	58,3 ab	5,2	9,5	7,3 a
4,4	47,5	33,3	40,4 ab	3,8	4,5	4,1 a
8,8	35,0	33,3	34,1 b	3,0	5,6	4,3 a
17,6	38,3	31,7	35,0 b	2,9	5,2	4,0 a
Média geral	51,2 A	40,0 B		4,0 B	6,8 A	
1º subcultivo (60 dias)						
Tratamentos	Explantes que regeneraram PLBs (%)			Número médio de PLBs		
BAP ( $\mu$ M)	Apical	Basal	Média geral	Apical	Basal	Média geral
0	76,7	50,0	63,3 ab	4,2	9,5	6,9 bc
1,1	55,0	48,3	51,7 ab	11,3	14,1	12,7 a
2,2	81,6	60,0	70,8 a	11,3	12,3	11,8 ab
4,4	47,5	43,3	45,4 ab	8,7	6,3	7,5 bc
8,8	35,0	40,0	37,5 b	5,0	7,2	6,1 c
17,6	43,3	36,7	40,0 b	5,3	8,2	6,7 bc
Média geral	56,5 A	46,4 A		7,6 B	9,6 A	
2º subcultivo (60 dias)						
Tratamentos	Explantes que regeneraram PLBs (%)			Número médio de PLBs		
BAP ( $\mu$ M)	Apical	Basal	Média geral	Apical	Basal	Média geral
0	76,7	50,0	63,3 ab	4,9	11,5	8,2 b
1,1	56,7	51,7	54,2 ab	16,1	19,2	17,7 a
2,2	81,67	60,0	70,8 a	13,4	16,7	15,1 ab
4,4	47,5	43,3	45,4 ab	11,3	9,4	10,3 ab
8,8	35,0	40,0	37,5 b	7,4	11,3	9,3 b
17,6	43,3	36,7	40,0 b	8,40	13,4	10,9 ab
Média geral	56,8 A	46,9 A		10,3 B	13,6 A	

Letras minúsculas iguais nas colunas e letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

PLBs= "protocorm like bodies"

meio sem regulador apresentaram porcentagem de regeneração significativamente superior à dos inoculados em meios com concentrações mais elevadas de BAP (8,8 e 17,6  $\mu\text{M}$ ), no cultivo inicial. No entanto, no primeiro e segundo subcultivo, os TCLs do meio contendo 2,2  $\mu\text{M}$  apresentaram porcentagem de regeneração superior à dos mantidos em meios com as maiores concentrações de BAP (TABELA 1). Em relação ao número médio de PLBs, os explantes da região basal apresentaram números maiores quando comparados ao da apical para todos os subcultivos testados (FIGURA 1B). As análises das concentrações de BAP indicaram que as melhores respostas de regeneração de PLBs foram obtidas com 2,2  $\mu\text{M}$  e as piores com as concentrações mais elevadas de BAP (8,8 e 17,6  $\mu\text{M}$ ). O número médio de PLBs aumentou com os subcultivos (TABELA 1).

### 3.2 TCLts DE PROTOCORMOS COM 90 DIAS DE IDADE

Nas TCLts de protocormos com 90 dias, a porcentagem de explantes regenerando PLBs foi maior para as secções basais do que à das apicais em todos os subcultivos testados (TABELA 2, ANEXOS 4, 5 e 6). Não houve diferença nas respostas de regeneração de PLBs nos explantes cultivados em meio na ausência ou presença de BAP, em nenhum dos cultivos (TABELA 2).

Os números médios de PLBs da região basal foram superiores ao da apical nos explantes cultivados em meio sem regulador e nas concentrações mais baixas de BAP (1,1 e 2,2  $\mu\text{M}$ ) e houve um aumento com o aumento dos subcultivos. Nas TCLts apicais, os números médios obtidos com a concentração de 8,8  $\mu\text{M}$  foram superiores aos das testemunhas, no primeiro e segundo subcultivo (TABELA 2). No entanto, para as TCLts basais, só ocorreu

diferença de resposta no segundo subcultivo, com o maior número médio de PLBs formado nos explantes cultivados em meio contendo 17,6  $\mu$ M, sendo superior ao obtido na concentração de 4,4  $\mu$ M de BAP (TABELA 2, FIGURA 1C).

TABELA 2. PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs E NÚMERO MÉDIO DE PLBs EM TCLts ORIUNDAS DE PROTOCORMOS DE *Hadrolaelia grandis* COM 90 DIAS DE IDADE, APÓS CULTIVO INICIAL (60 DIAS), PRIMEIRO SUBCULTIVO (60 DIAS) E SEGUNDO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO DE CULTURA WPM (CONTROLE) E ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6  $\mu$ M).

Cultivo inicial (60 dias)						
Tratamentos	Explantes que regeneraram PLBs (%)			Número médio de PLBs		
BAP ( $\mu$ M)	Apical	Basal	Média geral	Apical	Basal	Média geral
0	21,7	65,0	43,3 a	1,3 a B	6,5 a A	3,9
1,1	8,3	48,3	25,8 a	1,7 a B	7,0 a A	4,3
2,2	8,3	56,7	30,0 a	1,4 a B	7,2 a A	4,3
4,4	48,3	43,3	45,8 a	7,0 a A	4,1 a A	5,5
8,8	27,5	35,0	31,2 a	5,7 a A	7,5 a A	6,6
17,6	11,7	36,7	24,1 a	1,0 a A	8,8 a A	4,9
Média geral	21,0 B	45,8 A		3,0	6,9	

1° subcultivo (60 dias)						
Tratamentos	Explantes que regeneraram PLBs (%)			Número médio de PLBs		
BAP ( $\mu$ M)	Apical	Basal	Média geral	Apical	Basal	Média geral
0	23,3	66,7	45,0 a	1,8 b B	10,1 a A	5,9
1,1	11,7	48,3	30,0 a	3,9 ab B	10,6 a A	7,2
2,2	8,3	56,7	32,5 a	4,1 ab B	11,2 a A	7,6
4,4	50,0	50,0	50,0 a	9,1 ab A	7,6 a A	8,3
8,8	37,5	38,3	37,9 a	10,5 a A	11,2 a A	10,8
17,6	20,0	43,3	31,7 a	3,6 ab B	13,0 a A	8,3
Média geral	25,1 B	50,6 A		5,5	10,6	

2° subcultivo (60 dias)						
Tratamentos	Explantes que regeneraram PLBs (%)			Número médio de PLBs		
BAP ( $\mu$ M)	Apical	Basal	Média geral	Apical	Basal	Média geral
0	23,3	68,3	45,8 a	2,6 b B	11,4 ab A	7,0
1,1	11,7	48,3	30,0 a	8,1 ab A	12,4 ab A	10,2
2,2	8,3	56,7	32,5 a	6,2 ab A	12,8 ab A	9,5
4,4	50,0	50,0	50,0 a	11,7 ab A	9,6 b A	10,7
8,8	37,5	38,3	37,9 a	16,5 a A	18,0 ab A	17,2
17,6	21,7	43,3	32,5 a	5,8 ab B	20,7 a A	13,2
Média geral	25,4 B	50,8 A		8,5	14,1	

Letras minúsculas iguais nas colunas e letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

PLBs= "protocorm like bodies"

### 3.3 TCLIs DE PROTOCORMOS COM 60 DIAS DE IDADE

A concentração de BAP influenciou as respostas de regeneração de PLBs em todos os cultivos testados (TABELA 3, ANEXOS 7, 8 e 9). A técnica TCLI foi eficiente para os protocormos com elevada porcentagem de explantes regenerando PLBs, sendo que porcentagem menor de resposta foi observada apenas nas TCLIs cultivadas no meio de cultura com 4,4  $\mu\text{M}$  de BAP, onde apenas a metade dos explantes formaram PLBs (TABELA 3).

TABELA 3. PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs E NÚMERO MÉDIO DE PLBs EM TCLIs ORIUNDAS DE PROTOCORMOS DE *Hadrolaelia grandis* COM DIFERENTES IDADES, APÓS CULTIVO INICIAL (60 DIAS), PRIMEIRO SUBCULTIVO (60 DIAS) E SEGUNDO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO DE CULTURA WPM (CONTROLE) E ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6  $\mu\text{M}$ ).

Cultivo inicial (60 dias)				
BAP (μM)	Explantes que regeneraram PLBs (%)		Número médio de PLBs por explante	
	Idade dos protocormos		Idade dos protocormos	
	60 dias	90 dias	60 dias	90 dias
0	93,3 a	77,5 a	2,9 bc	4,7 b
1,1	97,5 a	58,3 a	3,2 abc	8,1 a
2,2	83,3 a	71,7 a	3,7 ab	8,2 a
4,4	65,0 b	76,7 a	3,8 a	7,9 a
8,8	86,7 a	81,7 a	3,4 abc	7,1 ab
17,6	85,0 a	58,3 a	2,7 c	9,3 a
Média geral	85,1	70,7	3,3	7,5
1ª Subcultivo (60 dias)				
BAP (μM)	Explantes que regeneraram PLBs (%)		Número médio de PLBs por explante	
	Idade dos protocormos		Idade dos protocormos	
	60 dias	90 dias	60 dias	90 dias
0	96,7 a	77,5 a	3,7 c	6,0 b
1,1	97,5 a	58,3 a	4,3 bc	10,9 a
2,2	88,3 a b	73,3 a	5,3 ab	10,6 a
4,4	70,0 b	78,3 a	5,3 ab	11,4 a
8,8	88,3 a b	83,3 a	5,6 a	10,9 a
17,6	93,3 a	65,0 a	4,7 abc	13,2 a
Média geral	89,0	72,6	4,8	10,5
2ª Subcultivo (60 dias)				
BAP (μM)	Explantes que regeneraram PLBs (%)		Número médio de PLBs por explante	
	Idade dos protocormos		Idade dos protocormos	
	60 dias	90 dias	60 dias	90 dias
0	98,3 a	80,0 a	4,0 b	7,0 d
1,1	97,5 a	58,3 a	6,1 ab	11,7 c
2,2	88,3 a	73,3 a	6,6 ab	14,3 bc
4,4	70,0 b	78,3 a	6,2 ab	15,8 abc
8,8	90,0 a	83,3 a	9,1 a	17,2 ab
17,6	93,3 a	70,0 a	8,4 a	19,1 a
Média geral	89,6	73,9	6,7	14,2

Letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

PLBs= "protocorm-like bodies"



O número médio de PLBs nas TCLIs de protocormos com 60 dias de idade aumentou com os subcultivos (FIGURA 1D). O menor número médio foi obtido no meio sem regulador vegetal após o primeiro e segundo subcultivos. As melhores respostas obtidas após primeiro e segundo subcultivos ocorreram em meio com 8,8  $\mu$ M de BAP (TABELA 3).

### 3.4 TCLI DE PROTOCORMOS DE 90 DIAS DE IDADE

De maneira geral, a porcentagem de regeneração de PLBs foi de aproximadamente 70%, tanto no cultivo inicial, como também nos subcultivos, sendo que a concentração de BAP não influenciou as respostas (TABELA 3, ANEXOS 10, 11 e 12). O número médio de PLBs aumentou com os subcultivos e o tratamento controle foi o que apresentou a menor média de PLBs por explante (TABELA 3). A melhor resposta dos TCLIs de 90 dias de idade foi obtida após o segundo subcultivo em meio WPM, contendo 8,8  $\mu$ M de BAP (83,3% de regeneração de PLBs e 17,2 PLBs) (FIGURA 1E) .

### 3.5 ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO

Os PLBs cultivados em meio sem regulador vegetal, na ausência ou presença de carvão ativado ou AIB apresentaram 100% de enraizamento. Os explantes se desenvolvendo em meio WPM com carvão ativado foram os que apresentaram as melhores respostas para massa fresca, número e comprimento médio de raízes e altura da parte aérea quando comparados ao tratamento controle (WPM, sem carvão ativado). No entanto, não houve diferenças significativas entre as três concentrações de carvão ativado testadas (1, 2 e 3 g L<sup>-1</sup>) para as variáveis analisadas (ANEXO 13, TABELA 4 e FIGURA 1 F). A adição de AIB não é recomendada para promover alongamento e

enraizamento dos PLBs de *H. grandis*, pois não houve diferença significativa entre o controle e nenhuma das concentrações testadas para todas as variáveis avaliadas, além das plantas serem menos vigorosas quando comparadas com as cultivadas em meio contendo carvão ativado (TABELA 4, ANEXO 14).

TABELA 4. ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE PLBs ORIUNDOS DA TCL de PROTOCORMOS DE *Hadrolaelia grandis* CULTIVADOS POR 120 DIAS EM MEIO WPM (CONTROLE) E ACRESCIDO DE CARVÃO ATIVADO OU ÁCIDO INDOL-3- BUTÍRICO (AIB) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.

	Massa fresca (g)	Número médio de raízes	Comprimento médio das raízes (cm)	Altura média da parte aérea (cm)
<b>Carvão ativado (g L<sup>-1</sup>)</b>				
Controle (0)	0,1068±0,0700 b	2,57±0,37 b	2,44±0,60 b	0,44±0,03 b
1,00	0,3771±0,0665 a	5,32±0,30 a	3,70±0,55 a	1,13±0,15 a
2,00	0,3480±0,1130 a	5,16±0,15 a	3,15±0,85 ab	1,22±0,34 a
3,00	0,3523±0,0564 a	5,27±0,80 a	3,57±0,40 a	1,24±0,32 a
Média geral	0,29605	4,58	3,21	1,01
<b>AIB (µM)</b>				
Controle (0)	0,1068±0,0700 a	2,57±0,37 a	2,44±0,60 a	0,44±0,03 a
1,25	0,1178±0,0633 a	3,26±0,90 a	2,22±0,83 a	0,52±0,17 a
2,50	0,0977±0,0275 a	3,10±0,57 a	2,30±0,87 a	0,53±0,13 a
5,00	0,1276±0,0299 a	3,28±0,83 a	2,75±0,80 a	0,55±0,11 a
10,00	0,1364±0,0468 a	3,62±1,10 a	2,26±0,94 a	0,51±0,15 a
Média geral	0,1172	3,16	2,39	0,51

As médias seguidas pelas mesmas letras na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os valores representam as médias ± desvio padrão.

PLBs= "protocorm-like bodies", TCL= "thin cell layer"

### 3.6 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO

Os resultados dos substratos testados indicaram que as mudas plantadas em vermiculita apresentaram porcentagem de sobrevivência superior (98,21%) quando comparada com casca de pinus com húmus de minhoca (76,79%), após 60 dias de aclimatização em casa de vegetação (TABELA 5, FIGURA 1G, ANEXO 15).



FIGURA 1. REGENERAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS (PLBs) DE *Hadrolaelia grandis*, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO EM MEIO WPM. A- TCLt APICAL DE PROTOCORMO COM 60 DIAS DE IDADE, CULTIVADO EM MEIO ACRESCIDO DE  $4,4 \mu\text{M}$  DE BAP. B- TCLt BASAL DE PROTOCORMO COM 60 DIAS DE IDADE CULTIVADO EM MEIO ACRESCIDO DE  $1,1 \mu\text{M}$  DE BAP. C- TCLt BASAL DE PROTOCORMO COM 90 DIAS DE IDADE CULTIVADO EM MEIO ACRESCIDO DE  $8,8 \mu\text{M}$  DE BAP. D- TCLi DE PROTOCORMO COM 60 DIAS DE IDADE APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO EM MEIO ACRESCIDO DE  $17,6 \mu\text{M}$  DE BAP. E- TCLi DE PROTOCORMO COM 90 DIAS DE IDADE APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO WPM ACRESCIDO DE  $8,8 \mu\text{M}$  DE BAP. FIGURAS 1A A 1E (BARRAS= 3 mm). F- ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE PLBs ORIUNDOS DE TCL CULTIVADOS POR 120 DIAS EM MEIO WPM ACRESCIDO DE  $2 \text{ g L}^{-1}$  DE CARVÃO ATIVADO. G- ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS APÓS 60 DIAS DE CULTIVO EM CASA DE VEGETAÇÃO. FIGURAS 1F e 1G (BARRAS= 30 mm).

TABELA 5. SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DE *Hadrolaelia grandis* ORIUNDAS DE TCLIs TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS E ACLIMATIZADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO POR 60 DIAS.

Substratos	Sobrevivência (%)
Pó de coco	87,50±17,68 ab
Casca de pínus com húmus de minhoca	76,79±13,36 b
Pó de coco + casca de pínus com húmus de minhoca + vermiculita	83,93±11,89 ab
Vermiculita	98,21± 04,72 a

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os valores representam as médias ± desvio padrão.

TCLl= "thin cell layer" longitudinal

#### 4 DISCUSSÃO

O protocormo demonstrou ser um explante eficiente para a propagação *in vitro* de *H. grandis* respondendo mesmo na ausência de regulador vegetal. Os protocormos, resultantes da germinação das orquídeas, são uma fase intermediária entre o embrião e a planta, sendo uma excelente fonte de explante para a regeneração de PLBs (TEIXEIRA DA SILVA *et al.*, 2006). As células dos protocormos são potencialmente meristemáticas, principalmente as do pólo superior que origina o meristema apical caulinar e são capazes de regenerar número elevado de PLBs (TEIXEIRA DA SILVA *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2015). Segundo Ferreira *et al.* (2015), a retirada do ápice caulinar causa a quebra da dominância apical e a adição de citocinina no meio de cultura promove a regeneração de PLBs.

A idade do protocormo e tipo de secção influenciou as respostas de indução e regeneração de PLBs, sendo que protocormos de 60 dias podem ser recomendados para a técnica de TCLt e de 90 dias para a de TCLl. Resultados semelhantes ocorreram com protocormos mais jovens (quatro semanas de idade), que os utilizados no presente estudo, com elevadas porcentagens de regeneração de PLBs em *Aerides crispum* (100%) (SHEELAVANTHMATH, *et al.*, 2005) e *Dendrobium gratiosissimum* (83%)

(JAIPHET e RANGAYATORN, 2010). Para *Epidendrum secundum*, 95% dos protocormos com 60 dias de idade responderam regenerando PLBs (FERREIRA *et al.*, 2015). Gomes *et al.* (2015) também obtiveram boas respostas com protocormos de 240 dias de *Brasilidium forbesii* utilizando a técnica TCLt e TCLi. Isso tem demonstrado que o protocormo é um explante responsivo e que a juvenilidade dos tecidos é um fator importante no controle da proliferação de células em orquídeas (ARDITTI e ERNST, 1993).

Para a técnica TCLt, além da idade, o tipo de secção e concentração de BAP influenciaram as respostas de regeneração de PLBs. De uma maneira geral, as secções basais foram mais responsivas e a concentração de 2,2  $\mu\text{M}$  foi recomendada para TCLt de protocormo de 60 dias e de 4,4  $\mu\text{M}$  para 90 dias. Murdad *et al.* (2006) também recomendaram as secções basais dos protocormos para a propagação *in vitro* de *Phalaenopsis gigantea*, sendo que o ferimento causado pela secção pode ter exercido um papel importante na proliferação de PLBs. Em *Brasilidium forbesii*, as TCLts basais e apicais não apresentaram diferença na porcentagem de regeneração, porém o número médio de PLBs foi maior nas TLCts da região basal após o primeiro subcultivo (GOMES *et al.*, 2015).

Os TCLts de protocormos de 60 dias de *H. grandis*, cultivados em meio WPM, contendo 2,2  $\mu\text{M}$  de BAP, apresentaram as melhores respostas de regeneração de PLBs, após o segundo subcultivo (70,8%, 15,1 PLBs por secção e 30,1 PLBs por explante), sendo produzidos 2131 PLBs, após 180 dias. No entanto, para os TCLts de protocormos de 90 dias, o meio acrescido de 4,4  $\mu\text{M}$  de BAP foi mais eficiente (50% de regeneração de PLB, 10,7 PLBs por secção e 21,3 PLBs por explante, sendo obtidos 1065 PLBs, após 180 dias.

Teng *et al.* (1997) também constataram que a resposta dos explantes na formação PLBs varia de espécie para espécie, de explante para explante e com a concentração de citocinina. Resultado semelhante foi obtido para *Aerides crispum*, em que protocormos de quatro semanas, seccionados ao meio e cultivados em meio MS, com 2  $\mu$ M de BAP também produziram 30,1 PLBs por explante, no entanto a porcentagem de regeneração de PLBs foi mais elevada (100%) (SHEELAVANTHMATH *et al.*, 2005). Nayak *et al.* (2002) obtiveram melhor resposta com TCLt de *Dendrobium nobile*, utilizando concentração mais elevada (11  $\mu$ M de BAP), com 87,85 % de regeneração de PLBs e 34 protocormos por explante.

Ao compararmos as respostas de regeneração de PLBs observamos maiores porcentagens com a técnica TCLI. Os TCLIs de protocormos de 60 dias, cultivados em meio WPM, contendo 8,8  $\mu$ M de BAP apresentaram 90% de regeneração de PLBs, 9,1 PLBs por secção e 18,2 PLBs por explante, após o segundo subcultivo. No entanto, para os TCLIs de protocormos de 90 dias, a porcentagem de regeneração de PLBs foi inferior (83,3%), mas o número médio foi quase o dobro (17,2 PLBs por secção e 34,4 por explante). Se fizermos uma estimativa de produção de PLBs, com TCLIs de protocormos de 90 dias, cultivados em meio WPM com 8,8  $\mu$ M de BAP, após o segundo subcultivo serão produzidos 2866 PLBs, enquanto que utilizando o mesmo meio com protocormos de 60 dias serão produzidos 1638 PLBs, após 180 dias. Gomes *et al.* (2015) também constataram que a técnica TCLI foi mais eficiente que a TCLt para protocormos de seis meses de idade de *Brasiliidium forbesii*. Para essa espécie também foi utilizado o meio WPM, sendo que a concentração de BAP recomendada foi inferior (2  $\mu$ M de BAP), com 77% de

regeneração de PLBs e 22,7 PLBs por explante, após o primeiro subcultivo. Existem poucos estudos utilizando a técnica de TCLI e ao contrário do que foi obtido no presente trabalho, as secções longitudinais de *Oncidium tigrinum* apresentaram danos severos e estresse, com pouca resposta, sendo recomendado o uso de protocormos inteiros (MATA-ROSAS *et al.*, 2011).

Os PLBs de *H. grandis* não necessitam de auxina para enraizar, pois em todos os meios testados, na ausência ou presença de carvão ativado e AIB todos os explantes enraizaram. No entanto, a adição do carvão ativado no meio WPM foi eficiente no alongamento e desenvolvimento das plântulas, com maior massa fresca, altura da parte aérea, comprimento e número de raízes. Como não houve diferença estatística para todas as variáveis analisadas em meio com as três concentrações de carvão ativado, recomendamos a adição de  $1 \text{ g L}^{-1}$  para reduzir o custo do protocolo de produção de mudas. Da mesma forma, Gomes *et al.* (2015) também constataram que AIB não é necessário para alongamento e desenvolvimento de raízes de *Brasilidium forbesii* e que a adição do carvão ativado proporcionou a formação de plantas mais vigorosas. Resultados similares também foram obtidos por Martin e Madassery (2006), que observaram maior número de raízes em híbridos de *Dendrobium* adicionando  $2 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado ao meio de cultura e para *Cattleya harrisoniana*, com melhores respostas para o comprimento e número de raízes com a adição de  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado (SCHNEIDERS *et al.*, 2012). Para outras espécies como *Anoectochilus formosanus* (KET *et al.*, 2004) e *Vanda coerulea* (ROY *et al.*, 2011), o carvão ativado foi benéfico não apenas para o enraizamento, mas também para o desenvolvimento da parte aérea, como foi observado nesse estudo com *H. grandis*. O carvão ativado adicionado ao meio

de cultura adsorve metabólitos produzidos pelo explante e liberados no meio de cultura, assim como compostos orgânicos que podem prejudicar o crescimento e o desenvolvimento das plantas (PAN e STADEN, 1998).

As plantas de *H. grandis* apresentaram elevada porcentagem de sobrevivência em casa de vegetação e quando foi utilizado vermiculita como substrato, a porcentagem foi superior (98,21%) à da casca de pinus com húmus de minhoca (76,79%). As orquídeas epífitas, como *H. grandis*, que vivem em ambientes oligotróficos, onde a disponibilidade de água é sazonal, possuem adaptações visando à máxima absorção e mínima perda de água (HELBSING *et al.*, 2000). O velame presente nas raízes das orquídeas epífitas é extremamente especializado na absorção de água da chuva e da umidade do ar. O substrato ideal para o cultivo *ex vitro* deve ter alta capacidade de absorção de água, alta porosidade, boa capacidade de drenagem e permitir boa aeração simulando as condições do habitat de orquídeas epífitas, evitando assim o apodrecimento das raízes e a morte da planta (DEBERGH e ZIMMERMAN, 1991). A vermiculita parece possuir essas características, pois foi o substrato que apresentou a maior porcentagem de sobrevivência das mudas de *H. grandis*, assim como *Anselia africana* (VASUDEVAN e VAN STADEN, 2010) e *Brasilidium forbesii* (GOMES *et al.*, 2015).

## 5 CONCLUSÕES

Foi estabelecido um protocolo de micropropagação para *H. grandis* utilizando a técnica TCL. A idade do protocormo, tipo de secção e concentração da citocinina BAP influenciam as respostas de regeneração de PLBs. Secções de protocormos de 60 dias são eficientes para a técnica TCLt e



devem ser utilizadas em meio de cultura WPM acrescido de 2,2  $\mu\text{M}$  de BAP. A técnica TCLI é recomendada para a regeneração de PLBs utilizando secções de protocormos de 90 dias de idade, cultivados em meio suplementado com 8,8  $\mu\text{M}$  de BAP. Os PLBs alongam e desenvolvem raízes em meio WPM, sem auxina e com a presença de carvão ativado (1 g L<sup>-1</sup>). As plantas podem ser aclimatizadas com sucesso utilizando vermiculita como substrato.

## REFERÊNCIAS

- ANTONIETTI, D.; BUTTINI, S.; DA COSTA ZONETTI, P.; GUIMARÃES, A. T. B.; STEFANELLO, S. Plant growth of *Laelia tenebrosa* Rolfe treated with gibberellic acid and grown on different substrates. **Idesia**, v. 32, n. 3, p. 7-11, 2014.
- ARAÚJO, D.; ARAÚJO, S. **Orquídeas Brasileiras**. Campinas: MM Comunicação Ltda, 2008. 225 p.
- ARDITTI, J., ERNST, R. **Micropropagation of Orchids**. New York: John Wiley & Sons, 1993. 682 p.
- BARROS, F. DE; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. Orchidaceae: In **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB64706>>. Acesso em: 25 Fev. 2015.
- COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 27, n. 1, p. 145-150, 2005.
- DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. 484 p.
- DEWIR, Y. H.; EL-MAHROUK, M. E.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Micropropagation of cattleya: Improved *in vitro* rooting and acclimatization. **Horticulture, Environment and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 89-93, 2015.
- DÍAZ, M.; DEL, S.S.; ÁLVAREZ, C. C. Plant regeneration through direct shoot formation from leaf cultures and from protocorm-like bodies derived from callus of *Encyclia mariae* (Orchidaceae), a threatened Mexican orchid. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 45, p. 162 - 170, 2009.
- FERREIRA, D. L.; SMIDT, E. C.; RIBAS, L. L. F. Efficient micropropagation of *Epidendrum secundum* Jacq. from leaves and protocorms. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 13, p. 1122-1128, 2015.
- FIGUEIREDO, L. D.; KOLB, R. A. Novo substrato para o cultivo de orquídeas: estudo do seu potencial de uso em plantas de *Laelia pulcherrima*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n.4, p. 405-413, 2013.
- GOMES, L. R. P.; FRANCESCHI, C. D. R. B.; RIBAS, L. L. F. Micropropagation of *Brasilidium forbesii* (Orchidaceae) through transverse and longitudinal thin cell layer culture. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, n. 2, p. 143-149, 2015

HELBSING, S.; RIEDERER, M.; ZOTZ, G. Cuticles of vascular epiphytes: efficient barriers for water loss after stomatal closure?. **Annals of Botany**, v. 86, n. 4, p. 765-769, 2000.

JAIPHET, C.; RANGSAYATORN, N. Micropropagation of a rare orchid *Dendrobium gratiosissimum* using thin cell layers. **Acta Horticulturae**, v. 878, p. 185 - 189, 2010.

JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, F. V. D. **Redução de custos na micropropagação**. In: Junghans, T. G.; Souza, A.S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. EMBRAPA MFT, Cruz das Almas, Brasil, p. 153-175, 2009.

KET, N. V.; HAHN, E. J.; PARK, S. Y.; CHAKRABARTY, D.; PAEK, K. Y. Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. **Biologia Plantarum**, v. 48, n. 3, p. 339-344, 2004.

LAUZER, D.; RENAUT, S.; ST-ARNAUD, M.; BARABÉ, D. *In vitro* asymbiotic germination, protocorm development, and plantlet acclimatization of *Aplectrum hyemale* (Muhl. ex Willd.) Torr.(Orchidaceae). **The Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 134, n. 3, p. 344-348, 2007.

LEE, Y.I.; HSU, S. T.; YEUNG, E. C. Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos. **American Journal of Botany**, v. 100, n.11, p. 2121-2131, 2013.

LLOYD, G.; McCOWN, B. H. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society**, v.30, p.421- 427, 1980.

LONE, A. B.; BARBOSA, C. M.; TAKAHASHI, L. S. A.; FARIA, R. T. Aclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em substratos alternativos ao xaxim e ao esfagno. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 4, p. 465-469, 2008.

MAHENDRAN, G.; BAI, V. N. Mass propagation of *Satyrium nepalense* D. Don. A medicinal orchid via seed culture. **Scientia Horticulturae**, v. 119, n. 2, p. 203-207, 2009.

MARTIN, K. P.; MADASSERY, J. Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm - like bodies. **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 95 - 99, 2006.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. Livro vermelho da flora do Brasil. Tradução Flávia Anderson, Chris Hieatt. - 1. ed. - Rio de Janeiro : Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

MATA-ROSAS, M.; BALTAZAR-GARCIA, R. J.; CHAVEZ-AVILA, V. M. *In vitro* regeneration through direct organogenesis from protocorms of *Oncidium tigrinum* Llave e Lex. (Orchidaceae), endemic and threatened mexican species. **HortScience**, v. 46, n. 8, p. 1132-1135, 2011.

MOHANTY, P.; DAS, M. C.; KUMARIA, S.; TANDON, P. High-efficiency cryopreservation of the medicinal orchid *Dendrobium nobile* Lindl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, n. 2, p. 297-305, 2012a.

MOHANTY, P.; PAUL, S.; DAS, M. C.; KUMARIA, S.; TANDON, P. A simple and efficient protocol for the mass propagation of *Cymbidium mastersii*: an ornamental orchid of Northeast India. **AoB Plants**, pls023, 2012b.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.

MURDAD, R.; HWA, K. S.; SENG, C. K.; LATIP, M. A.; AZIZ, Z. A.; RIPIN, R. High frequency multiplication of *Phalaenopsis gigantea* using trimmed bases protocorm technique. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 73 – 79, 2006.

NAING, A. H.; CHUNG, J. D.; PARK, I. S.; LIM, K. B. Efficient plant regeneration of the endangered medicinal orchid, *Coelogyne cristata* using protocorm-like bodies. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 659-666, 2011.

NAYAK, N. R.; SAHOO, S.; PATNAIK, S.; RATH, P. S. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) SW. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orquidaceae). **Scientia Horticulturae**, v.94, n. 1-2, p. 107-116, 2002.

NHUT, D. T.; TEIXEIRA DA SILVA, J.A.; ASWATH, C.R. The importance of the explants on regeneration in thin cell layer technology. **In Vitro Cellular Developmental & Biology - Plant**, v. 39, p. 266-276, 2003.

NOVAK, S. D.; LUNA, L. J.; GAMAGE, R. N. Role of auxin in orchid development. **Plant Signaling & Behavior**, v. 9, n. 10, e972277, 2014.

PANT, B.; THAPA, D. *In vitro* mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. through shoot tip culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 42, p. 9970-9974, 2012.

PAN, M. J.; VAN STADEN, J. The use of charcoal *in vitro* culture – a review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, n. 3, p.155 -163, 1998.

RAFIQUE, R.; FATIMA, B.; MUSHTAQ, S.; IQBAL, M. S.; RASHEED, M.; ALI, M.; HASAN, S. Z. U. Effect of indole-3-butyric acid (IBA) on *in vitro* root induction in *Dendrobium* orchid (*Dendrobium sabin* H.) **African Journal of Biotechnology**. v. 11, n. 20, p. 4673 - 4675, 2012.

RANGSAYATORN, N. Micropropagation of *Dendrobium draconis* Rchb. f. from thin cross-section culture. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 4, p. 662 – 665, 2009.

ROY, A. R.; PATEL, R. S.; PATEL, V. V.; SAJEEV, S.; DEKA, B. C. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl.(Blue Vanda): an *in vitro* protocol for an endangered orchid. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 3, p. 325-331, 2011.

- SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n.2, p. 185 -191, 2012.
- SEBASTINRAJ, J.; BRITTO, S. J.; KUMAR, D. V.; ROBINSON, J. P.; THANGAVEL, P. Rapid Propagation of *Vanda testacea* (Lindl.) Rchb. F.–A highly medicinal value epiphytic orchid of India. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 10, n. 5, p. 223-230, 2014.
- SHEELAVANTHMATH, S. S., MURTHY, H. N., HEMA, B. P., HAHN, E. J., & PAEK, K. Y. High frequency of protocorm like bodies (PLBs) induction and plant regeneration from protocorm and leaf sections of *Aerides crispum*. **Scientia Horticulturae**, v.106, n. 3, 395-401, 2005.
- SINGH, S. K.; RAI, M. K.; SAHOO, L. An improved and efficient micropropagation of *Eclipta alba* through transverse thin cell layer culture and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 328-333, 2012.
- TAO, J.; YU, L.; KONG, F.; ZHAO, D. Effects of plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Cymbidium faberi* Rolfe. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 69, p. 15639-15646, 2011.
- TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.12, p.683-691, 2003.
- TEIXEIRA DA SILVA, J.A. Thin cell layers: power-tool for organogenesis of floricultural crops. In: JAIN, S.M.; OCHATT, S. J. **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants**. New York: Humana Press, p. 377-391, 2010.
- TEIXEIRA DA SILVA, J.A.; SINGH, N.; TANAKA, M. Priming biotic factors for optimal protocorm-like body and callus induction in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae), and assessment of cytogenetic stability in regenerated plantlets. **Plant Cell, Tissue Organ and Culture** v. 84, n. 4, p. 135-144, 2006.
- TEIXEIRA DA SILVA, J.A.; YAM, T.; FUKAI, S.; NAYAK, N.; TANAKA, M. Establishment of optimum nutrient media for in vitro propagation of *Cymbidium Sw* (Orchidaceae) using protocorm-like body segments. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 5, n. 3, p. 129-136, 2005.
- TENG, W.-L.; NICHOLSON, L.; TENG, M.-C. Micropropagation of *Spathoglottis plicata*. **Plant Cell Reports**, v. 16, n. 12, p. 831-835, 1997.
- VASUDEVAN, R.; VAN STADEN, J. *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. **Scientia Horticulturae**, v. 123, n. 4, p. 496-504, 2010.
- ZHAO, P.; WANG, W.; FENG, F. S.; WU, F.; YANG, Z. Q.; Wang, W. J. High-frequency shoot regeneration through transverse thin cell layer culture in *Dendrobium candidum* Wall Ex Lindl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, n. 2, p. 131-139, 2007.

## ANEXOS

ANEXO 1. ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLts ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 60 DIAS DE IDADE APÓS CULTIVO INICIAL (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E WPM ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6  $\mu$ M).

Fontes de variação	Número médio de PLBs		
	GL	QM	F
Concentrações de BAP	5	14,68595	3,7805 *
Região do protocormo	1	71,85388	18,4966 **
Concentrações de BAP x Região do protocormo	5	2,43091	0,6258 ns
Tratamentos	11	14,31256	3,6843 **
Erro experimental	24	3,88471	
Total	35		
Coeficiente de variação (%)	36,39		

Fontes de variação	Explantos que regeneraram PLBs (%)		
	GL	QM	F
Concentrações de BAP	5	907,39583	4,4941 **
Região do protocormo	1	1139,06250	5,6414 *
Concentrações de BAP x Região do protocormo	5	294,06250	1,4564 ns
Tratamentos	11	649,66856	3,2176 **
Erro experimental	24	201,90972	
Total	35		
Coeficiente de variação (%)	31,14		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )

ns não significativo ( $p \geq 0,05$ )

ANEXO 2. ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLts ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 60 DIAS DE IDADE APÓS PRIMEIRO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO WPM, SEM REGULADOR VEGETAL E ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6  $\mu$ M).

Fontes de variação	Número médio de PLBs		
	GL	QM	F
Concentrações de BAP	5	49,23481	6,1451 **
Região do protocormo	1	34,73138	4,3349 *
Concentrações de BAP x Região do protocormo	5	9,73002	1,2144 ns
Tratamentos	11	29,95959	3,7393 **
Erro experimental	24	8,01209	
Total	35		
Coeficiente de variação (%)	32,84		

Fontes de variação	Explantos que regeneraram PLBs (%)		
	GL	QM	F
Concentrações de BAP	5	1054,89583	4,6776 **
Região do protocormo	1	925,17361	4,1024 ns
Concentrações de BAP x Região do protocormo	5	208,50694	0,9246 ns
Tratamentos	11	658,38068	2,9194 *
Erro experimental	24	225,52083	
Total	35		
Coeficiente de variação (%)	29,18		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )

ns não significativo ( $p \geq 0,05$ )

ANEXO 3. ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLts ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 60 DIAS DE IDADE APÓS SEGUNDO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6  $\mu$ M).

Fontes de variação	Número médio de PLBs		
	GL	QM	F
Concentrações de BAP	5	80,32748	4,4041 **
Região do protocormo	1	98,73734	5,4135 *
Concentrações de BAP x Região do protocormo	5	12,56451	0,6889 <sup>ns</sup>
Tratamentos	11	51,19975	2,8071 *
Erro experimental	24	18,23923	
Total	35		
Coeficiente de variação (%)	35,83		

Fontes de variação	Explantos que regeneraram PLBs (%)		
	GL	QM	F
Concentrações de BAP	5	1062,39583	4,6115 **
Região do protocormo	1	875,17361	3,7988 <sup>ns</sup>
Concentrações de BAP x Região do protocormo	5	212,67361	0,9231 <sup>ns</sup>
Tratamentos	11	659,13826	2,8611 *
Erro experimental	24	230,38194	
Total	35		
Coeficiente de variação (%)	29,26		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )

<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ )

ANEXO 4. ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLts ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 90 DIAS DE IDADE APÓS CULTIVO INICIAL (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6  $\mu$ M).

Fontes de variação	Número médio de PLBs		
	GL	QM	F
Concentrações de BAP	5	6,05829	0,7414 <sup>ns</sup>
Região do protocormo	1	133,40250	16,3263 **
Concentrações de BAP x Região do protocormo	5	21,89519	2,6796 *
Tratamentos	11	24,83363	3,0392 *
Erro experimental	24	8,17100	
Total	35		
Coeficiente de variação (%)	57,81		

Fontes de variação	Explantos que regeneraram PLBs (%)		
	GL	QM	F
Concentrações de BAP	5	494,34028	2,1719 <sup>ns</sup>
Região do protocormo	1	5562,67361	24,4401 **
Concentrações de BAP x Região do protocormo	5	593,50694	2,6076 <sup>ns</sup>
Tratamentos	11	1000,17361	4,3944 **
Erro experimental	24	227,60417	
Total	35		
Coeficiente de variação (%)	45,17		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )

<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ )

ANEXO 5. ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLts ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 90 DIAS DE IDADE APÓS PRIMEIRO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6  $\mu$ M).

Fontes de variação	Número médio de PLBs		
	GL	QM	F
Concentrações de BAP	5	15,96794	1,8040 <sup>ns</sup>
Região do protocormo	1	236,03201	26,6655 **
Concentrações de BAP x Região do protocormo	5	29,38011	3,3192 *
Tratamentos	11	42,07021	4,7528 **
Erro experimental	24	8,85157	
Total	35		
Coeficiente de variação (%)	36,94		

Fontes de variação	Explantos que regeneraram PLBs (%)		
	GL	QM	F
Concentrações de BAP	5	392,67361	1,1360 <sup>ns</sup>
Região do protocormo	1	5814,06250	16,8202 **
Concentrações de BAP x Região do protocormo	5	668,22917	1,9332 <sup>ns</sup>
Tratamentos	11	1010,77967	2,9242 *
Erro experimental	24	345,65972	
Total	35		
Coeficiente de variação (%)	49,12		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )

<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ )

ANEXO 6. ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLts ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 90 DIAS DE IDADE APÓS SEGUNDO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6  $\mu$ M).

Fontes de variação	Número médio de PLBs		
	GL	QM	F
Concentrações de BAP	5	74,83390	3,9310 **
Região do protocormo	1	289,56694	15,2108 **
Concentrações de BAP x Região do protocormo	5	52,96556	2,7823 *
Tratamentos	11	84,41494	4,4343 **
Erro experimental	24	19,03692	
Total	35		
Coeficiente de variação (%)	38,55		

Fontes de variação	Explantos que regeneraram PLBs (%)		
	GL	QM	F
Concentrações de BAP	5	395,72917	1,1357 <sup>ns</sup>
Região do protocormo	1	5814,06250	16,6861 **
Concentrações de BAP x Região do protocormo	5	689,89583	1,9800 <sup>ns</sup>
Tratamentos	11	1022,01705	2,9331 *
Erro experimental	24	348,43750	
Total	35		
Coeficiente de variação (%)	48,96		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )

<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ )



ANEXO 7. ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLIs ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 60 DIAS DE IDADE APÓS UM CULTIVO INICIAL (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6  $\mu$ M).

Fontes de variação	Número médio de PLBs		
	GL	QM	F
Tratamentos	5	0,50489	5,8632 **
Erro experimental	12	0,08611	
Total	17		
Coefficiente de variação (%)	8,92		

Fontes de variação	Explantos que regeneraram PLBs (%)		
	GL	QM	F
Tratamentos	5	380,34722	8,1141 **
Erro experimental	12	46,87500	
Total	17		
Coefficiente de variação (%)	7,96		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ )

ANEXO 8. ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLIs ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 60 DIAS DE IDADE APÓS PRIMEIRO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6  $\mu$ M).

Fontes de variação	Número médio de PLBs		
	GL	QM	F
Tratamentos	5	1,60889	8,4927 **
Erro experimental	12	0,18944	
Total	17		
Coefficiente de variação (%)	9,05		

Fontes de variação	Explantos que regeneraram PLBs (%)		
	GL	QM	F
Tratamentos	5	307,01389	6,3612 **
Erro experimental	12	48,26389	
Total	17		
Coefficiente de variação (%)	7,80		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ )

ANEXO 9. ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLIs ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 60 DIAS DE IDADE APÓS SEGUNDO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6  $\mu$ M).

Fontes de variação	Número médio de PLBs		
	GL	QM	F
Tratamentos	5	9,89956	6,4539 **
Erro experimental	12	1,53389	
Total	17		
Coefficiente de variação (%)	18,36		

Fontes de variação	Explantos que regeneraram PLBs (%)		
	GL	QM	F
Tratamentos	5	323,12500	7,5659 **
Erro experimental	12	42,70833	
Total	17		
Coefficiente de variação (%)	7,30		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ )

ANEXO 10. ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLIs ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 90 DIAS DE IDADE APÓS CULTIVO INICIAL (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6  $\mu$ M).

Fontes de variação	Número médio de PLBs		
	GL	QM	F
Tratamentos	5	7,42367	7,4819 **
Erro experimental	12	0,99222	
Total	17		
Coeficiente de variação (%)	13,19		

Fontes de variação	Explantos que regeneraram PLBs (%)		
	GL	QM	F
Tratamentos	5	305,34722	2,6251 <sup>ns</sup>
Erro experimental	12	116,31944	
Total	17		
Coeficiente de variação (%)	15,26		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ )

<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ )

ANEXO 11. ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLIs ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 90 DIAS DE IDADE APÓS PRIMEIRO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6  $\mu$ M).

Fontes de variação	Número médio de PLBs		
	GL	QM	F
Tratamentos	5	17,20800	14,7077 **
Erro experimental	12	1,17000	
Total	17		
Coeficiente de variação (%)	10,27		

Fontes de variação	Explantos que regeneraram PLBs (%)		
	GL	QM	F
Tratamentos	5	260,34722	2,1121 <sup>ns</sup>
Erro experimental	12	123,26389	
Total	17		
Coeficiente de variação (%)	15,28		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ )

<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ )

ANEXO 12. ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM TCLIs ORIUNDOS DE PROTOCORMOS COM 90 DIAS DE IDADE, APÓS SEGUNDO SUBCULTIVO (60 DIAS) EM MEIO WPM (CONTROLE) E ACRESCIDO DE BAP (1,1; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6  $\mu\text{M}$ ).

Fontes de variação	Número médio de PLBs		
	GL	QM	F
Tratamentos	5	55,96767	24,6493 **
Erro experimental	12	2,27056	
Total	17		
Coefficiente de variação (%)	10,62		

Fontes de variação	Explantos que regeneraram PLBs (%)		
	GL	QM	F
Tratamentos	5	242,22222	2,3890 <sup>ns</sup>
Erro experimental	12	101,38889	
Total	17		
Coefficiente de variação (%)	13,63		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ )

<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ )

ANEXO 13. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE PLBs DE EM WPM (CONTROLE) E WPM ACRESCIDO DE CARVÃO ATIVADO (1, 2 E 3 g.  $\text{L}^{-1}$ ).

Fonte de variação	Massa fresca (g)		
	GL	QM	F
Tratamentos	3	0,08045	12,7310 **
Erro experimental	16	0,00632	
Total	19		
Coefficiente de variação (%)	26,85		

Fonte de variação	Número médio de raízes		
	GL	QM	F
Tratamentos	3	8,99361	40,4243 **
Erro experimental	16	0,22248	
Total	19		
Coefficiente de variação (%)	10,30		

Fonte de variação	Comprimento médio das raízes (cm)		
	GL	QM	F
Tratamentos	3	1,59656	4,1412 *
Erro experimental	16	0,38553	
Total	19		
Coefficiente de variação (%)	19,32		

Fonte de variação	Altura média da parte aérea (cm)		
	GL	QM	F
Tratamentos	3	0,72313	11,9272 **
Erro experimental	16	0,06063	
Total	19		
Coefficiente de variação (%)	24,42		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )

ANEXO 14. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE PLBs EM MEIO WPM (CONTROLE) E ACRESCIDO DE AIB (1,25; 2,5; 5,0 E 10,0 µM).

Fonte de variação	Massa fresca (g)		
	GL	QM	F
Tratamentos	4	0,00121	0,4747 <sup>ns</sup>
Erro experimental	20	0,00255	
Total	24		
Coeficiente de variação (%)	4,07		

Fonte de variação	Número médio de raízes		
	GL	QM	F
Tratamentos	4	0,73042	1,1531 <sup>ns</sup>
Erro experimental	20	0,63344	
Total	24		
Coeficiente de variação (%)	25,15		

Fonte de variação	Comprimento médio das raízes (cm)		
	GL	QM	F
Tratamentos	4	0,23015	0,3487 <sup>ns</sup>
Erro experimental	20	0,65993	
Total	24		
Coeficiente de variação (%)	33,93		

Fonte de variação	Altura média da parte aérea (cm)		
	GL	QM	F
Tratamentos	4	0,00850	0,5071 <sup>ns</sup>
Erro experimental	20	0,01676	
Total	24		
Coeficiente de variação (%)	25,35		

<sup>ns</sup> não significativo (p >= 0,05)

ANEXO 15. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DE *Hadrolaelia grandis* ORIUNDAS DE TCLs TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS E ACLIMATIZADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO POR 60 DIAS.

Fontes de variação	Sobrevivência (%)		
	GL	QM	F
Tratamentos	3	260,41667	1,8421 <sup>ns</sup>
Erro experimental	24	141,36905	
Total	27		
Coeficiente de variação (%)	13,18		

<sup>ns</sup> não significativo (p >= 0,05)

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O banco de sementes é viável para *H. grandis*, porém, testes de viabilidade, como o TZ e germinação *in vitro*, com sementes armazenadas por períodos superiores aos 36 meses devem ser realizados para verificar por quanto tempo é possível manter sua viabilidade.

O meio WPM foi eficiente não só para a germinação, como também para o desenvolvimento dos protocormos. No entanto, é necessário fazer avaliações do desenvolvimento dos protocormos até que eles apresentem a primeira raiz e isso ocorre geralmente após 120 dias de cultivo.

A regeneração de plantas por meio da técnica TCL foi eficiente para a espécie estudada e com a adição de BAP ao meio de cultura foi possível aumentar o número de PLBs formados por explante. Constatou-se que o aumento de subcultivos aumentou o número médio de PLBs, com isso poderiam ser testados mais subcultivos para avaliar a produção total de PLBs. Essa citocinina, combinada com auxina (AIB ou ANA) poderia ser testada visando induzir um maior alongamento das plantas.

Como as orquídeas apresentam desenvolvimento lento, novos estudos que possibilitem a produção de mudas de maneira mais rápida, são necessários. Recomenda-se também fazer a reintrodução da espécie em seu habitat natural e isso irá contribuir para a conservação de *H. grandis*.